

Immunregulation durch adoptiven Transfer humaner CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen im xenogenen GvHD-Modell



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III -
Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tina Böld aus Regensburg
Februar 2009

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2004 bis Februar 2009 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Matthias Edinger in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 18. Februar 2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD. Dr. Thomas Langmann
Prof. Dr. Matthias Edinger

Prüfungsausschuss: 1. Gutachter: PD. Dr. Thomas Langmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Edinger
3. Gutachter: Prof. Dr. Richard Warth
Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst Tamm

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DAS IMMUNSYSTEM	1
1.1.1	DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM.....	2
1.1.2	DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM.....	3
1.1.2.1	B-Lymphozyten.....	3
1.1.2.2	T-Lymphozyten.....	4
1.1.3	DIE ADAPTIVE IMMUNANTWORT	6
1.2	TOLERANZ	7
1.2.1	ZENTRALE TOLERANZ.....	7
1.2.2	PERIPHERE TOLERANZ	9
1.2.2.1	Intrinsische Toleranzmechanismen.....	9
1.2.2.2	Extrinsische Toleranzmechanismen.....	10
1.3	REGULATORISCHE T-ZELLEN	10
1.3.1	ADAPTIVE REGULATORISCHE T-ZELLEN: TH3/TR1	11
1.3.2	CD4 ⁺ CD25 ⁺ REGULATORISCHE T-ZELLEN	13
1.3.2.1	Entstehung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen	13
1.3.2.2	Phänotypische und funktionelle Eigenschaften von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen.....	15
1.3.2.3	Mechanismen der Suppression durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen	16
1.3.2.4	Die Rolle von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen bei Krankheiten	18
1.4	ALLOGENE KNOCHENMARKTRANSPLANTATION	20
1.4.1	DIE GVHD	21
1.4.2	DIE ROLLE VON CD4 ⁺ CD25 ⁺ TREG-ZELLEN BEI DER GVHD	23
2	ZIELSETZUNG	25
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	MATERIAL	26
3.1.1	ALLGEMEINE VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	26
3.1.2	GERÄTE.....	26
3.1.3	MEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN	27
3.1.4	ENZYME, INHIBITOREN UND MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS.....	30
3.1.5	FARBSTOFFE UND STIMULANZIEN	30
3.1.6	ANTIKÖRPER.....	30
3.1.7	BEADS	32
3.1.8	OLIGONUKLEOTIDE.....	32
3.1.9	SOFTWARE UND INTERNETDIENSTE	33
3.1.10	VERSUCHSTIERE	33
3.1.11	PRIMÄRE ZELLEN UND ZELLINIEN	33
3.2	METHODEN	34
3.2.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	34
3.2.1.1	Ermittlung der Zellzahl	34
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	34
3.2.1.3	Auftauen von Zellen.....	35
3.2.1.4	Dichtegradientenzentrifugation	35
3.2.1.5	Antikörperfärbung	35
3.2.1.5.1	Oberflächenfärbung	35
3.2.1.5.2	Intranukleärfärbung für FOXP3	35
3.2.1.5.3	Intrazellulärfärbung für Zytokine.....	36

3.2.1.6	Durchflusszytometrie	36
3.2.1.7	Fluoreszente Zellsortierung.....	37
3.2.1.8	Magnetische Zellseparation (MACS).....	38
3.2.1.9	Isolierung von Treg- und T-Zell-Subpopulationen	38
3.2.1.10	Kultivierung von Treg- und T-Zell-Subpopulationen.....	39
3.2.1.10.1	Expansion von Treg- und T-Zell-Subpopulationen.....	39
3.2.1.10.2	L-Zellkultur	39
3.2.1.10.3	TCE-Kultur	40
3.2.1.10.4	Ruhigstellen <i>in vitro</i> expandierter Zellen.....	40
3.2.1.10.5	Kurzzeitstimulation von Treg- und T-Zell-Subpopulationen.....	40
3.2.1.11	Cytometric bead array (CBA)	41
3.2.1.12	CFSE-Färbung.....	41
3.2.1.13	Suppressions-Assay	42
3.2.1.14	³ [H]-Thymidin-Proliferationstest.....	43
3.2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	44
3.2.2.1	Western-Blot-Analyse.....	44
3.2.2.1.1	Herstellung von Gesamt-Zelllysaten für die Western-Blot-Analyse	44
3.2.2.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.2.2.1.3	Western-Blot	45
3.2.2.1.4	Detektion membrangebundener Proteine durch Antikörper	45
3.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA.....	46
3.2.2.3	Reverse Transkription	46
3.2.2.4	<i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion	47
3.2.3	TIERMODELL	49
3.2.3.1	Mauszucht und Haltung.....	49
3.2.3.2	Blutabnahme.....	49
3.2.3.3	Aufarbeitung von Blutproben zur durchflusszytometrischen Analyse	50
3.2.3.4	Töten von Mäusen	50
3.2.3.5	Sektion von Mäusen.....	50
3.2.3.6	Histopathologie und Gewebefixierung.....	50
3.2.3.6.1	Gewebefixierung und Entkalkung von Knochen.....	50
3.2.3.6.2	Hämatoxylin/Eosin Färbung	51
3.2.3.6.3	Histopathologie	51
3.2.3.7	Aufarbeitung von Milz und Knochenmark für durchflusszytometrische Analysen	51
3.2.3.8	Allogenes Transplantationsmodell	52
3.2.3.8.1	Isolierung von murinen Knochenmarkszellen.....	52
3.2.3.8.2	Isolierung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen bzw. CD4 ⁺ CD25 ⁻ Tkonv-Zellen aus murinen Milzzellen.....	53
3.2.3.8.3	Bestrahlung der Mäuse	54
3.2.3.8.4	Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen	54
3.2.3.8.5	Bewertung der GvHD	54
3.2.3.9	Xenogenes Transplantationsmodell.....	54
3.2.3.9.1	Isolierung humaner Zellen.....	54
3.2.3.9.2	Bestrahlung der Mäuse	55
3.2.3.9.3	Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen	55
3.2.3.9.4	Bewertung der xenogenen Erkrankung	55
3.2.4	STATISTIK.....	56
4	ERGEBNISSE	57
4.1	MAUSMODELL DER ALLOGENEN KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION	57
4.1.1	INDUKTION DER AKUTEN GVHD NACH ALLOGENER KMT	57
4.1.2	CHIMÄRISMUS- UND REKONSTITUTIONSANALYSEN.....	60
4.1.3	ZIELGORGANE DER AKUTEN GVHD	62
4.1.4	SUPPRESSIVE AKTIVITÄT MURINER CD4 ⁺ CD25 ⁺ TREG-ZELLEN <i>IN VITRO</i>	65

4.1.5	SUPPRESSIVE AKTIVITÄT MURINER CD4 ⁺ CD25 ⁺ TREG-ZELLEN <i>IN VIVO</i>	68
4.2	CHARAKTERISIERUNG <i>IN VITRO</i> EXPANDIERTER HUMANER TREG-ZELLEN.....	73
4.2.1	FOXP3-EXPRESSION IN HUMANEN CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} TREG-ZELLEN VOR UND NACH EXPANSION.....	74
4.2.1.1	Ermittlung eines geeigneten Haushaltsgens zur Quantifizierung der FOXP3 mRNA- Expression in expandierten Treg-Zellen	76
4.2.1.2	FOXP3-Expression in humanen CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg-Zellen vor und nach Expansion	77
4.2.1.3	FOXP3-Expression in humanen konventionellen T-Zellen nach Aktivierung	79
4.2.2	SUPPRESSIVE AKTIVITÄT <i>IN VITRO</i> EXPANDIERTER CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} TREG-ZELLEN.....	80
4.2.3	CHARAKTERISIERUNG NAIVER UND ANTIGENERFAHRENER CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH} TREG-ZELLEN	82
4.3	MAUSMODELL DER XENOGENEN GVHD.....	89
4.3.1	CHARAKTERISIERUNG VON RAG2 ^{-/-} TC ^{-/-} -MÄUSEN	89
4.3.2	XENOGENES TRANSPLANTATIONSMODELL	92
4.3.2.1	Analyse der xGvHD-induzierenden Zellen	92
4.3.2.2	Kinetik des Engraftments humaner Zellen.....	95
4.3.2.3	Expansion humaner Zellsubpopulationen in der Milz	96
4.3.2.4	Zielorgane der xenogenen Erkrankung	99
4.3.2.5	Einfluss humaner Zellen auf die murine Hämatopoese	101
4.3.3	ADOPTIVER TRANSFER <i>IN VITRO</i> EXPANDIERTER HUMANER TREG-ZELLEN	104
4.3.3.1	Der Einfluss <i>in vitro</i> expandierter humaner Treg-Zellen auf das Überleben nach xenogener Transplantation.....	105
4.3.3.2	Migration und Überleben <i>in vitro</i> expandierter Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell	108
4.3.3.3	Einfluss von exogen zugeführtem humanem IL-2 auf die suppressive Aktivität <i>in</i> <i>vitro</i> expandierter RA ⁺ Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell.....	109
4.3.3.4	Verzögerter adoptiver Transfer <i>in vitro</i> expandierter Treg-Zellen	111
4.3.3.5	Einfluss <i>in vitro</i> expandierter Treg-Zellen auf die frühe Expansion humaner Zellen	113
4.3.3.6	Einfluss <i>in vitro</i> expandierter Treg-Zellen auf die Zytokinproduktion humaner Zellen in der Frühphase nach xenogener Transplantation.....	115
4.3.3.7	Einfluss <i>in vitro</i> expandierter Treg-Zellen auf Organschäden in der Frühphase nach xenogener Transplantation.....	116
5	DISKUSSION	118
5.1	CHARAKTERISIERUNG <i>IN VITRO</i> EXPANDIERTER HUMANER NATÜRLICHER TREG-ZELLEN	118
5.2	MAUSMODELL DER AKUTEN GVHD	126
5.3	MAUSMODELL DER XENOGENEN GVHD.....	129
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	138
7	LITERATUR	141
8	ANHANG.....	156
9	PUBLIKATIONEN	157
10	DANKSAGUNG	159
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	161

Abbkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AICD	<i>activation induced cell death</i>
AIRE	<i>Autoimmune Regulator</i>
Ak	Antikörper
ALPS	autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
APC	Antigenpräsentierende Zelle oder Allophycocyanin
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BCR	<i>B cell receptor</i>
bzw.	beziehungsweise
β2M	beta-2-Mikroglobulin
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CCR7	Chemokinrezeptor 7
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD25	α-Kette des IL-2-Rezeptors
CD45	Tyrosinphosphatase, existiert in den zwei Isoformen RA und RO
CD62L	L-Selektin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i>
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>threshold cycle</i>
cTEC	<i>cortical thymic epithelial cell</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
γc	<i>common γ-chain</i> (gemeinsame γ-Kette der Rezeptoren für die Interleukine 2, 4, 7, 9 und 15)

d	Tag
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppeltnegativ
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphat
DP	doppeltpositiv
DR5	<i>death receptor 5</i> (Todesdomäne)
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	humaner <i>forkhead box P3</i> Transkriptionsfaktor
Foxp3	muriner <i>forkhead box P3</i> Transkriptionsfaktor
FSc	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
G	Guanin
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GITR	<i>glucocorticoid induced tumor necrosis factor</i>
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GMP	<i>granulo/myelomonocytic progenitor</i>
GPR	G-Protein-gekoppelte Rezeptor
GvHD	<i>Graft-versus-Host Disease</i> (Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung)
Gy	Gray
h	Stunde oder human
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation

HSV	Herpes simplex Virus
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IPEX	<i>Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
LAG3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
m	Meter
m	milli (10^{-3})
m	murin
MACS	Magnetische Zellseparation (magnetic cell separation)
MBL	mannosebindendes Lektin
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MCMV	murines Cytomegalievirus
MEP	<i>megakaryotic/erythroid progenitor oder murine erythroid precursor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MLR	gemischte Leukozyten-Reaktion (<i>mixed leukocyte reaction</i>)
MNC	<i>mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
MTA	<i>material transfer agreement</i>
mTEC	<i>medullary thymic epithelial cell</i>
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})

NaCl	Natriumchlorid
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
p	pico (10^{-12})
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PB	peripheres Blut
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PPR	<i>pattern recognition</i> Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant
RAG	<i>recombination-activating gene</i>
RA ⁺ Treg-Zellen	CD45RA exprimierende naive Treg-Zellen
RA ⁻ Treg-Zellen	CD45RA negative antigenerfahrene Treg-Zellen
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s.	siehe
<i>scid</i>	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of mean</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SSc	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
T	Thymidin
T1D	Typ-1 Diabetes
TCE	<i>T Cell Expander</i>
TCGF	<i>t cell growth factor</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>

TCR-tg	TCR-transgen
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
Tkonv-Zelle	konventionelle T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tr1-Zellen	Typ-1-regulatorische Zellen
Treg-Zelle	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
TSDR	<i>Treg-specific demethylated region</i>
TZD	T-Zell-depletiert
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
wks	<i>weeks</i>
x	xenogen
xD	<i>xenogeic Disease</i> (xenogene Erkrankung)
xGvHD	xenogene GvHD
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Humane Hämatopoese	1
Abb. 1-2: Regulatorische T-Zellen	12
Abb. 1-3: Dualismus der Spender-T-Zellen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation	21
Abb. 1-4: Pathophysiologie der akuten GvHD	22
Abb. 3-1: Polyklonale Expansionssysteme	39
Abb. 4-1: Murines Modell der allogenen KMT und der akuten GvHD	58
Abb. 4-2: Gewichtsverlauf, GvHD-Score und Überleben von BALB/c-Mäusen nach allogener KMT	59
Abb. 4-3: Chimärismusanalyse von BALB/c-Mäusen nach allogener KMT	60
Abb. 4-4: Rekonstitution der Hämatopoese in BALB/c-Mäusen nach allogener KMT	61
Abb. 4-5: Zelluläre Zusammensetzung des KM und der Milz von BALB/c-Mäusen nach allogener KMT	63
Abb. 4-6: Histologie der Haut, der Leber und des Darms von BALB/c Mäusen nach allogener KMT	64
Abb. 4-7: Schema des Versuchsaufbaus zur Analyse der suppressiven Aktivität muriner CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen in der MLR	65
Abb. 4-8: Reinheitsgrad der FACS-aufgereinigten CD4 ⁺ CD25 ⁺ - und CD4 ⁺ CD25 ⁻ - Zellpopulation	66
Abb. 4-9: Dosisabhängige Suppression der Proliferation alloreaktiver CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen in der MLR	67
Abb. 4-10: Gewichtsverlauf, GvHD-Score und Überleben nach adoptivem Transfer CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen	69
Abb. 4-11: Rekonstitution der Hämatopoese im peripheren Blut nach adoptivem Transfer CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen	70
Abb. 4-12: Zelluläre Zusammensetzung des KM und der Milz nach adoptivem Transfer CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen	71
Abb. 4-13: Histologie der Haut, der Leber und des Darms von BALB/c Mäusen nach adoptivem Transfer CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Zellen	72
Abb. 4-14: Phänotyp humaner natürlich vorkommender Treg-Zellen im PB	73
Abb. 4-15: FOXP3-Expression in sortierten CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulationen	75
Abb. 4-16: Expression der Haushaltsgene GAPDH und 18S rRNA in sortierten CD4 ⁺ T- Zellsubpopulationen nach Aktivierung	77
Abb. 4-17: FOXP3 mRNA-Expression <i>in vitro</i> expandierter humaner CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg- Zellen	78
Abb. 4-18: FOXP3 Proteinexpression <i>in vitro</i> expandierter humaner CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg- Zellen	79
Abb. 4-19: FOXP3 mRNA-Expression <i>in vitro</i> aktivierter humaner konventioneller CD4 ⁺ CD25 ^{neg} und CD8 ⁺ T-Zellen	80

Abb. 4-20: Suppressive Aktivität expandierter humaner CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg-Zellen <i>in vitro</i> ..	81
Abb. 4-21: Expression der Lymphknoten- <i>homing</i> -Rezeptoren CCR7 und CD62L auf <i>in vitro</i> expandierten humanen CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg-Zellen	83
Abb. 4-22: FOXP3 mRNA Expression <i>in vitro</i> expandierter CD62L und CCR7 koexprimierender CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg-Zellen vor und nach Expansion	84
Abb. 4-23: Phänotyp naiver (CD45RA ⁺) und antigenerfahrener (CD45RA ⁻) CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg-Zellen im PB adulter Spender.....	85
Abb. 4-24: FOXP3-Expression naiver (RA ⁺) und antigenerfahrener (RA ⁻) CD4 ⁺ CD25 ^{high} Treg-Zellen im Verlauf der Expansion.....	87
Abb. 4-25: Suppressive Aktivität expandierter RA ⁺ bzw. RA ⁻ Treg-Zellen <i>in vitro</i>	88
Abb. 4-26: Phänotyp von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} Mäusen	90
Abb. 4-27: Hämatopoese in KM und Milz von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäusen.....	91
Abb. 4-28: Chimärismusanalyse nach xenogener Transplantation	93
Abb. 4-29: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach xenogener Transplantation	94
Abb. 4-30: Verteilung hCD45 ⁺ Zellen in KM und Milz von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} Mäusen nach xenogener Transplantation.....	96
Abb. 4-31: Expansion humaner Lymphozyten in der Milz von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäusen nach xenogener Transplantation.....	97
Abb. 4-32: Quantitative Analyse humaner Zytokine im Serum von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäusen nach xenogener Transplantation	99
Abb. 4-33: Histologie der Lunge, Leber, Haut und des Darms von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäusen nach xenogener Transplantation	100
Abb. 4-34: Zelluläre Zusammensetzung des PB, der Milz und des KM von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäusen nach xenogener Transplantation.....	102
Abb. 4-35: Zelluläre Zusammensetzung der Milz und des KM von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäusen nach xenogener Transplantation.....	103
Abb. 4-36: Histologie der Milz und des KM von RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäusen nach xenogener Transplantation	104
Abb. 4-37: Phänotyp <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ und RA ⁻ Treg-Zellen vor xenogener Transplantation	105
Abb. 4-38: Chimärismusanalyse nach adoptivem Transfer <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ bzw. RA ⁻ Treg-Zellen	106
Abb. 4-39: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach adoptivem Transfer <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ bzw. RA ⁻ Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell	107
Abb. 4-40: Migration und Überleben <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ Treg-Zellen nach xenogener Transplantation	109
Abb. 4-41: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach adoptivem Transfer <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ Treg-Zellen und Administration von humanem IL-2	110
Abb. 4-42: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach zeitverzögertem Transfer <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ bzw. RA ⁻ Treg-Zellen	112
Abb. 4-43: Expansion humaner Zellen in der Milz 10 und 14 Tage nach Transfer <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ bzw. RA ⁻ Treg-Zellen	114

Abb. 4-44: Zytokinproduktion konventioneller T-Zellen nach Transfer <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ bzw. RA ⁻ Treg-Zellen	116
Abb. 4-45: Histologische Beurteilung der Leber nach Transfer <i>in vitro</i> expandierter RA ⁺ bzw. RA ⁻ Treg-Zellen	117
Abb. 8-1: Methylierung der TSDR des FOXP3-Gens in frisch isolierten und <i>in vitro</i> expandierten RA ⁺ und RA ⁻ Treg-Zellen	156

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Im Laufe der Evolution haben sich zwei miteinander kooperierende Abwehrsysteme entwickelt, die den menschlichen Körper vor Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten schützen und entartete körpereigene Zellen erkennen und beseitigen. Dabei unterscheidet man das angeborene und das erworbene oder adaptive Immunsystem [1]. Die Zellen beider Abwehrsysteme stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab (**Abb. 1-1**), die in verschiedene Zelltypen differenzieren und so unterschiedliche Funktionen bei der Immunabwehr ausüben können.

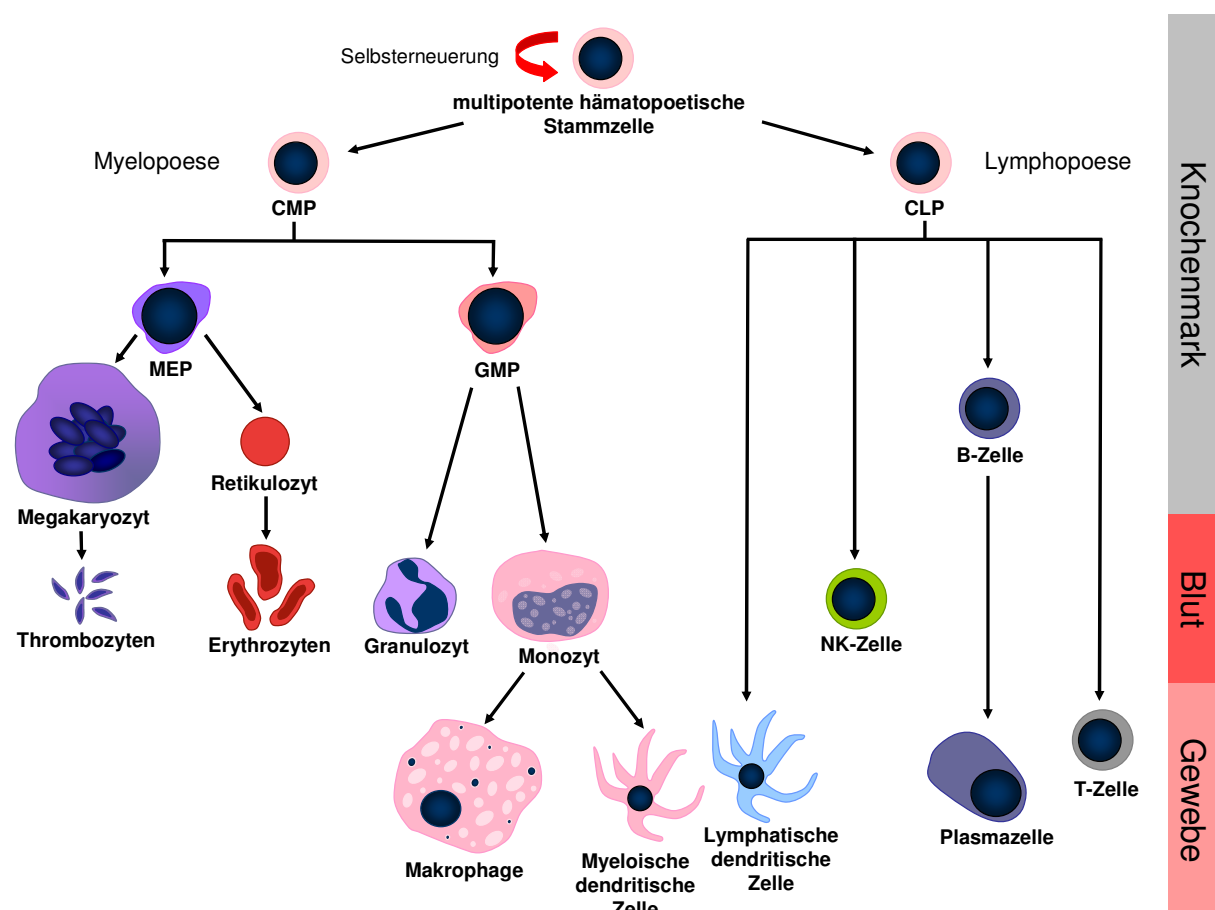


Abb. 1-1: Humane Hämatopoese.

Multipotente hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark differenzieren in gemeinsame myeloische Vorläuferzellen (*common myeloid precursor*, CMP) und gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen (*common lymphoid precursor*, CLP). Aus CMPs entwickeln sich über weitere Vorläuferstufen Zellen der myeloischen Reihe: Erythrozyten und Thrombozyten aus MEPs (*megakaryotic/erythroid progenitor*) sowie aus GMPs (*granulo/myelomonocytic progenitor*) Granulozyten und Monozyten. Letztere differenzieren im Gewebe zu Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs). Aus CLPs differenzieren NK-Zellen (Natürliche Killerzellen), T-Zellen (T-Lymphozyten), B-Zellen (B-Lymphozyten) und DCs. (verändert nach [2]).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Krankheitserreger besteht aus physikalisch-chemischen Barrieren. Die Haut sowie die Schleimhäute des Atem-, Verdauungs- und Genitaltrakts stellen im intakten Zustand eine physische Schranke dar, die von Erregern nicht ohne weiteres passiert werden kann. Der saure pH-Wert der Hautoberfläche und des Magensaftes sind chemische „Waffen“, die eine Besiedelung mit Mikroorganismen verhindern. Des Weiteren enthalten Körpersekrete wie Speichel, Tränen und Schleim bakterizide Proteine wie das Lysozym, das Zellwände verschiedener Bakterien enzymatisch abbaut und diese dadurch zerstört. Die Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute produzieren Cystein-reiche Peptide, so genannte Defensine, die als natürliche Antibiotika wirken und gegen ein breites Spektrum von Bakterien und Pilzen wirksam sind [3].

Hat ein Erreger dennoch die äußeren Barrieren überwunden, treten Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität in Kraft, die Strukturen des Eindringlings erkennen. So enthält das Blut Proteine wie mannosebindendes Lektin (MBL), C-reaktives Protein (CRP) und Proteine des Komplementsystems, die an mikrobielle Erreger binden und so durch Opsonisierung zur Phagozytose der Zielzelle führen oder diese direkt lysieren. Phagozytose ist ein grundlegender Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems und wird von speziellen Leukozyten - den Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten - übernommen, die Mikroben aufnehmen und in ihren Lysosomen mit Hilfe verschiedener Enzyme und niedrigem pH-Wert verdauen. Makrophagen sind besonders effiziente Phagozyten. Sie besiedeln Gewebe wie den Respirationstrakt, das subepitheliale Bindegewebe, die Sinusoide der Leber, der Milz und Lymphknoten und besetzen somit strategisch günstige Orte, um eindringende Pathogene abzufangen. Monozyten und Neutrophile zirkulieren in der Blutbahn und werden während einer Entzündungsreaktion durch chemische Signale (Chemokine) zu den Orten der Infektion rekrutiert. Die Aktivierung von Phagozyten am Ort der Infektion führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, die letztlich die Entzündungsreaktion verstärken. Weitere zelluläre Effektoren des angeborenen Immunsystems sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die Tumorzellen oder von Viren und anderen intrazellulären Mikroben befallene körpereigene Zellen lysieren.

Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen mikrobielle Erreger mit Hilfe von Keimbahn-kodierten Rezeptoren, den so genannten *pattern recognition* Rezeptoren (PPR) [4]. Die Spezifität der angeborenen Immunantwort ist genetisch festgelegt und umfasst etwa 10^3 verschiedene PPRs. Da Mikroorganismen sehr heterogen sind und eine hohe Mutationsrate haben wird durch Erkennen invarianter Strukturen eine breite Masse an Erregern bekämpft. PPRs erkennen in der Regel hochkonservierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), wie etwa die bakteriellen

Zellwandbestandteile Lipopolysaccharid (LPS), Mannose und Peptidoglykan sowie Nukleinsäuren von Bakterien und Viren [5].

Ein Großteil einfacher Infektionen kann durch das angeborene Immunsystem erkannt und erfolgreich bekämpft werden. Da die angeborene Abwehr nicht auf die Vermehrung hochspezifischer Abwehrzellen angewiesen ist, kann sie mit Hilfe eines bestehenden Repertoires an Zellen schnell auf eine Infektion reagieren. Dennoch haben viele pathogene Erreger Strategien entwickelt, die angeborene Immunantwort zu umgehen. Deren Bekämpfung benötigt somit potentere Abwehrmechanismen, die durch das adaptive Immunsystem vermittelt werden.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das erworbene oder adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus sowie der Fähigkeit, sich an Pathogene zu erinnern. Durch dieses immunologische Gedächtnis können Erreger bei erneuter Infektion rascher und wirkungsvoller bekämpft werden [6]. Die zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems setzen sich aus antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC) sowie B- und T-Lymphozyten zusammen. Diese Lymphozyten besitzen spezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, mit welchen sie molekulare Strukturen eines Pathogens oder einer Fremdschubstanz erkennen. Da die Erkennung eines Antigens durch Lymphozyten hoch spezifisch ist, können vom Gesamtrepertoire der Lymphozyten selbst minimale Antigenunterschiede nah verwandter Erreger differentiell erkannt werden. Der Antigen-Rezeptor wird während der Reifung des Lymphozyten durch somatische Rekombination von Rezeptor-Gensegmenten gebildet, so dass theoretisch etwa 10^{14} verschiedene B-Zell-Rezeptoren und 10^{18} verschiedene T-Zell-Rezeptorspezifitäten zur Verfügung stehen [3]. Gelangt ein Fremd-Antigen in den Körper, wird der hierfür spezifische Lymphozytenklon aktiviert und expandiert (klonale Selektion [7]). Generell unterscheidet man zwei unterschiedliche Typen der adaptiven Immunantwort: die durch B-Lymphozyten vermittelte humorale Immunantwort und die von T-Lymphozyten ausgelöste zellvermittelte Immunantwort.

1.1.2.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark aus einer den Lymphozyten gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP). Reife B-Zellen verlassen das Knochenmark, zirkulieren im Blut und Lymphgefäßsystem und besiedeln sekundäre lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten. Der B-Zell Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) besteht aus einer antigenbindenden Einheit, ein in der Plasmamembran verankertes Immunglobulin (Ig), und einer signalweiterleitenden Einheit, den Ig- α und Ig- β Proteinen [8].

Wird die B-Zelle durch Bindung eines Antigens an ihren Rezeptor aktiviert, differenziert sie zur Plasmazelle, die dann Antikörper mit derselben Antigenspezifität produziert und sezerniert. Nach Bindung an das Antigen können Antikörper zur Neutralisierung von Toxinen bzw. Pathogenen führen oder durch Aktivierung des Komplementsystems bzw. von NK-Zellen die Lyse des Erregers hervorrufen. Zudem erleichtert die Bindung der Antikörper die Phagozytose der Antikörper-ummantelten Partikel. Die humorale Immunantwort dient vor allem der Bekämpfung extrazellulärer Pathogene, wie Parasiten und Bakterien sowie deren Toxine.

1.1.2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entwickeln sich wie B-Zellen aus den CLP im Knochenmark, die als Vorläuferzellen über die Blutbahn in den Thymus wandern und dort heranreifen [9]. Der T-Zell Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) ist ein in der Plasmamembran verankerter Proteinkomplex aus zwei Untereinheiten, der strukturelle Ähnlichkeiten mit einem Antikörpermolekül hat [10]. Man unterscheidet $\alpha\beta$ T-Zellen, deren TCR aus einer α - und einer β -Polypeptidkette besteht, und $\gamma\delta$ T-Zellen, deren TCR aus einer γ - und einer δ -Polypeptidkette besteht. Des Weiteren sind – ähnlich wie beim BCR – auch beim TCR Proteine assoziiert, die für die Signaltransduktion nach Aktivierung der T-Zelle von Bedeutung sind. Die Signaleinheit des TCR-Komplexes besteht aus den Heterodimeren CD3 $\epsilon\gamma$ und CD3 $\epsilon\delta$ und dem Homodimer $\zeta\zeta$. Reife T-Zellen verlassen den Thymus, zirkulieren in der Blutbahn sowie den Lymphgefäßen und besiedeln sekundäre lymphatische Organe. Der Großteil peripherer T-Zellen sind $\alpha\beta$ T-Zellen, während $\gamma\delta$ T-Zellen nur etwa 1-5 % der T-Lymphozyten im peripheren Blut, den Lymphknoten und der Milz ausmachen. Dagegen findet man diese vermehrt im epithelialen Gewebe der Haut und der Schleimhäute, weshalb angenommen wird, dass $\gamma\delta$ T-Zellen der immunologischen Überwachung der Körperoberflächen dienen. Die genaue Funktion und Spezifität der $\gamma\delta$ T-Zellen ist noch weitgehend unbekannt [1].

Während der BCR extrazelluläre bzw. an der Zelloberfläche gebundene und intakte Antigene erkennt, bindet der TCR nur Antigenfragmente/Peptide, die über Antigenpräsentationsmoleküle auf der Oberfläche anderer körpereigener Zellen präsentiert werden. Diese Moleküle werden von den Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) kodiert und spielen unter anderem auch eine wichtige Rolle für die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen [11]. Da der TCR nur an MHC-Moleküle gebundene Peptide erkennt, wird die Antigenspezifität der T-Zellen auch als MHC-restringiert bezeichnet [12]. Die Genregion des MHC kann in 3 Gruppen unterteilt werden [13]: MHC-Gene der Klasse I kodieren für Proteine, die für die Präsentation intrazellulärer Antigene, wie etwa viraler oder bakterieller Proteine, benötigt werden und auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert werden [14]. MHC-Gene der Klasse II

kodieren für Proteine, die präferentiell für die Präsentation extrazellulärer Antigene durch APCs benötigt werden. Gene der MHC Klasse III Region enthalten unter anderem für Komplementkomponenten kodierende Gene. T-Zellen tragen neben ihrem TCR spezielle Korezeptoren, die an MHC-Moleküle binden und zum einen an der Signaltransduktion nach Aktivierung beteiligt sind und zum anderen die Bindung zur APC verstärken [15]. Es gibt zwei unterschiedliche Korezeptoren – CD4 und CD8 –, welche die beiden großen Subgruppen innerhalb der T-Zellen definieren.

CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die auf APCs über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. APCs werden anhand ihrer Fähigkeit Antigen zu präsentieren in 2 Typen unterteilt. Professionelle APCs, wie dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC), Makrophagen und B-Zellen, exprimieren konstitutiv MHC-II-Moleküle und können effektiv extrazelluläre Antigene aufnehmen und prozessieren [13]. Nicht-professionelle APCs, wie Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen, exprimieren MHC-II-Moleküle erst nach Stimulation. CD4⁺ T-Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet, die nach Aktivierung Zytokine produzieren, welche die Aktivierung und Rekrutierung anderer Immunzellen beeinflussen und damit die Immunantwort unterstützen. Anhand ihres Zytokinprofils und der Interaktionspartner unterscheidet man Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) und Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen) [16, 17]. Th1-Zellen produzieren proinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interferon (IFN) γ , Interleukin (IL) 2 und Tumornekrosefaktor (TNF) und stimulieren die Phagozytose durch Makrophagen sowie die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen. Sie stärken dadurch die zellvermittelte Immunantwort und dienen der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen. Th2-Zellen produzieren präferentiell IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und stimulieren die Proliferation und Antikörperproduktion von B-Zellen. Damit verstärken sie die humorale Immunantwort und tragen zur Bekämpfung extrazellulärer Pathogene und Parasiten bei.

Neben der vereinfachenden Unterteilung in Th1- und Th2-Zellen wurde mittlerweile ein weiterer Typ von CD4⁺ Helferzellen beschrieben, der sich anders als Th1- oder Th2-Zellen entwickelt und vermehrt IL-17 sezerniert [18]. Diese als Th17-Zellen bezeichnete Subpopulation der T-Helferzellen dient der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen, deren Abwehr nicht durch Th1- und Th2-Zellen gewährleistet werden kann [19]. Zudem scheinen Th17-Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Autoimmunerkrankungen zu spielen. Wie im Folgenden noch beschrieben, unterscheidet man von den genannten CD4⁺ T-Helferzellen noch regulatorisch wirksame Typ-3-T-Helferzellen sowie Typ-1-regulatorische T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (s. 1.3).

CD8⁺ T-Zellen werden als zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL) bezeichnet und erkennen Antigene, die über MHC-I-Moleküle präsentiert werden. Die Aufgabe von CD8⁺ T-Zellen ist das Erkennen und Beseitigen von Virus-infizierten oder entarteten Körperzellen. Aktivierte CTLs zerstören ihre Zielzellen durch die Induktion von

Apoptose^a, die sie über unterschiedliche Wege auslösen können [20]. Die Einteilung der T-Zellen in CD4⁺ Helferzellen und CD8⁺ CTLs ist sehr vereinfachend, da sowohl CD4⁺ T-Zellen zytotoxisch wirken als auch CD8⁺ T-Zellen Eigenschaften einer Helferzelle besitzen können.

1.1.3 Die adaptive Immunantwort

Naive Lymphozyten zirkulieren kontinuierlich durch die Blutbahn und das lymphatische System. Sekundäre lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten sind die Orte an denen sich APCs anreichern und wo in der Regel eine adaptive Immunantwort induziert wird. Für deren Initiation werden zwei Signale benötigt [6]. Das erste Signal entsteht durch die Bindung des antigenspezifischen Rezeptors des Lymphozyten an den MHC-Antigen-Komplex. Das zweite Signal wird durch die von einem Pathogen verursachte Immunaktivierung oder durch das Pathogen selbst geliefert. Dieses "*Danger-Signal*" stellt sicher, dass die adaptive Immunantwort nur durch eine Infektion ausgelöst wird und nicht durch harmlose körpereigene Strukturen. Zweite Signale für B-Zellen sind unter anderem Komplementproteine, die, an Mikroben gebunden, mit Oberflächenrezeptoren auf B-Zellen interagieren und dadurch die B-Zell-Antwort verstärken [21]. CD4⁺ T-Zellen reagieren mit so genannten kostimulatorischen Molekülen, die professionelle APCs nach Stimulierung über ihre PPRs exprimieren. Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle sind B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die vom Rezeptor CD28 auf der Oberfläche CD4⁺ T-Zellen erkannt werden. Die naive T-Zelle wird erst dann von einer APC vollständig aktiviert, wenn sowohl der TCR das Antigen über MHC-II-Moleküle als auch CD28 ein B7 Protein bindet. Die Bindung des B7 Proteins an CD28 führt zur Bildung anti-apoptotischer Moleküle sowie des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 und fördert dadurch das Überleben der Zelle sowie deren Fähigkeit eine Immunantwort auszubilden [22]. Ohne Kostimulation wird keine Immunantwort ausgelöst, sondern die Zelle in Apoptose oder in einen inaktiven Zustand versetzt, der als klonale Anergie bezeichnet wird [23].

Nach erfolgreicher Aktivierung synthetisieren Lymphozyten eine Vielzahl an Proteinen, die für die nachfolgenden Differenzierungsprozesse benötigt werden. Im Falle der T-Zellen wird nach Aktivierung verstärkt IL-2 gebildet und die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors^b (IL-2R) erhöht [24]. Die Interaktion zwischen IL-2 und dem IL-2R fördert die Proliferation und Differenzierung der T-Zelle und ist somit eine wichtige Voraussetzung für die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Der vermehrten Proteinsynthese folgt eine extensive Proliferation des antigenspezifischen Lymphozyten, was als klonale Expansion bezeichnet wird. Bei akuten viralen Infektionen kann die absolute Zahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen

^a **Apoptose** ist eine Form des Zelltodes, der durch eine Reihe proteolytischer Enzyme (Caspasen) vermittelt wird. Apoptotische Zellen werden rasch von Phagozyten aus dem Organismus entfernt.

^b Der **hochaffine IL-2-Rezeptor** besteht aus den Untereinheiten CD25 (α -Kette), CD122 (β -Kette) und CD132 (γ -Kette).

innerhalb weniger Tage um das 100.000-fache zunehmen [5]. Im Anschluss differenzieren antigenspezifische Lymphozyten entweder zu kurzlebigen Effektorzellen, die das Antigen eliminieren, oder zu langlebigen Gedächtniszellen. CD8⁺ Effektorzellen zerstören infizierte Zellen, während Th1-Effektor-Zellen Phagozyten aktivieren und die Zytotoxizität von CD8⁺ CTLs verstärken. Th2-Effektor-Zellen stimulieren die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zur Produktion verschiedener Antikörperklassen. Gedächtniszellen überleben in einem funktionell ruhenden Zustand für viele Jahre und können bei einer wiederholten Konfrontation mit dem Antigen eine schnellere und wirksamere sekundäre Immunantwort ausbilden.

Nach Eliminierung des Antigens kehrt das Immunsystem wieder in seinen Ausgangszustand zurück. Ein Großteil der durch klonale Expansion entstandenen Effektorzellen geht aufgrund fehlender Überlebenssignale in Apoptose (*death by neglect*). Die einzigen Indikatoren für den erfolgten Antigenkontakt sind langlebige Gedächtniszellen, die im Körper zirkulieren. Eine im Vergleich zu naiven Zellen erhöhte Produktion anti-apoptotischer Proteine [25] sowie die Zytokine IL-2, IL-7 und IL-15 tragen zum Erhalt dieser Gedächtniszellen bei [26-28].

1.2 Toleranz

Die genetische Variabilität des adaptiven Immunsystems ermöglicht die effiziente Bekämpfung einer Vielzahl von Pathogenen, birgt aber die Gefahr, dass Lymphozyten körpereigene Strukturen (Autoantigene) erkennen und dadurch Autoimmunerkrankungen auslösen. Die molekularen Mechanismen der Bildung von Antigenrezeptoren sind zufällig und werden nicht davon beeinflusst, was körpereigen oder -fremd ist. Daher entstehen in jedem Individuum Lymphozyten, die potentiell Autoantigene erkennen. Die Fähigkeit des Immunsystems, „fremd“ von „selbst“ zu unterscheiden und so Autoantigene zu ignorieren, wird als immunologische Selbsttoleranz bezeichnet. Hierbei werden zentrale und periphere Toleranzmechanismen unterschieden.

1.2.1 Zentrale Toleranz

Die zentrale Toleranz beschreibt den Vorgang der Selektion von Rezeptorspezifitäten heranreifender Lymphozyten in primären Lymphorganen. Für B-Zellen findet diese im Knochenmark und für T-Zellen im Thymus statt. Die zentrale Selbsttoleranz wird durch die Diversität der Autoantigene, die dem heranreifenden Lymphozytenrepertoire zur Verfügung gestellt wird, bestimmt. Die entstehenden T-Zellen werden im Thymus durch zwei verschiedene Kontrollmechanismen selektioniert, die gewährleisten, dass nur reife T-Zellen mit funktionellem und selbsttolerantem TCR den Thymus verlassen [29].

T-Zellvorläufer gelangen über die Blutbahn in den Thymus, exprimieren zu diesem Zeitpunkt weder einen TCR, CD8 noch CD4 und werden als doppeltnegative (DN) Thymozyten bezeichnet. Während weiterer Reifestadien im Kortex des Thymus und nach Umlagerung der TCR-Gene (V- (*variability*), D- (*diversity*) und J-Elemente (*joining*) der β -Kette) exprimieren sie diese zusammen mit CD3 und einer prä-TCR α -Kette in einem Komplex, der als prä-TCR bezeichnet wird. Ab diesem Zeitpunkt tragen sie sowohl CD8 als auch CD4 auf ihrer Oberfläche (doppeltpositive (DP) Thymozyten). Ab dieser Stufe werden die Gensegmente der TCR α -Kette (V- und J-Elemente) umgelagert und der DP Thymozyt trägt nun einen funktionstüchtigen TCR. Epithelzellen im Kortex (*cortical thymic epithelial cell* cTEC) und der Medulla (mTEC) des Thymus exprimieren MHC-Moleküle der Klasse I und II. Über diese präsentieren sie Autoantigene, die fast alle Gewebe repräsentieren, mit denen T-Zellen in der Peripherie in Kontakt kommen können. Die Fähigkeit der TECs eine große Vielfalt gewebsspezifischer Antigene zu exprimieren wird als promiskuitive Genexpression bezeichnet [30].

Im Kortex des Thymus findet die positive Selektion statt, bei der nur DP Thymozyten Überlebenssignale erhalten, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen (MHC-Restriktion). Die positive Selektion bestimmt darüber hinaus die Restriktion der unreifen T-Zellen auf MHC-I- oder MHC-II-Moleküle, da DP Thymozyten, die mit MHC-I Molekülen interagierten, in der Folge den Korezeptor CD8 stabil exprimieren und CD4 verlieren, während sich Thymozyten nach Erkennung von MHC-II-Molekülen zu CD4⁺ T-Zellen entwickeln. Kann ein TCR kein MHC erkennen, gehen diese Thymozyten in Apoptose, was für 90-95 % der DP Thymozyten zutrifft [31].

Der sich anschließende Vorgang der negativen Selektion findet in der Medulla des Thymus statt. Bindet ein TCR mit hoher Avidität einen Peptid-MHC-Komplex auf mTECs oder spezialisierten hämatopoetischen APCs des Thymus, werden diese Thymozyten deletiert, wodurch ein Export autoreaktiver T-Zellen aus dem Thymus vermieden wird. Im Unterschied zum passiven Zelltod sind bisher unbekannte aktive apoptoseinduzierende Signale für das Sterben der Zelle verantwortlich [29]. Die promiskuitive Genexpression ermöglicht es mTECs, ein Abbild der in der Peripherie zugänglichen Antigene zu präsentieren. Der Ubiquitin-Ligase AIRE (*Autoimmune Regulator*) kommt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Bedeutung zu, da sie die heterotope Expression von Autoantigenen in mTECs fördert. Störungen dieser zentralen Toleranzmechanismen, z.B. durch Mutationen von AIRE, führen zu schweren Autoimmunerkrankungen [32].

1.2.2 Periphere Toleranz

Die negative Selektion im Thymus ist lückenhaft, da selbst in gesunden Individuen autoreaktive T-Zellen nachgewiesen werden können [33-35]. Diese autoreaktiven Zellen werden in der Regel durch periphere Toleranzmechanismen in Schach gehalten. Diese können anhand ihrer Wirkungsweise in intrinsische und extrinsische Mechanismen unterteilt werden [36, 37].

1.2.2.1 Intrinsische Toleranzmechanismen

Die einfachste Form eines intrinsischen Toleranzmechanismus ist die Ignoranz. Als Ignoranz bezeichnet man die fehlende Reaktivität von T-Zellen trotz Vorhandensein des spezifischen Antigens. Sie kommt vor allem an immunprivilegierten Stellen des Körpers vor, wie etwa in Gehirn, Auge, Plazenta und Hoden. An diesen Orten sind Autoantigene nicht oder nur schwer zugänglich [38-40] und werden in zu geringer Zahl präsentiert, um T-Zellen ausreichend zu stimulieren [41].

Alternativ zur Ignoranz kann das Erkennen von Autoantigenen zu einer funktionellen Inaktivierung von T-Zellen führen. Dieser Zustand der T-Zellen wird als Anergie bezeichnet und durch TCR-Stimulation ohne gleichzeitige Kostimulation erzeugt [42]. Darüber hinaus wird Anergie nicht nur passiv durch das Fehlen von Kostimulation induziert, sondern auch aktiv über inhibitorische Rezeptoren wie z.B. CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), einem Homolog von CD28. CTLA-4 bindet mit hoher Affinität an B7-1- und B7-2-Proteine auf APCs [43, 44] und spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Anergie *in vivo* [45, 46]. CTLA-4-defiziente Mäusen entwickeln eine massive Lymphoproliferation mit Infiltration und Zerstörung diverser Organe, die letztendlich zum Tode führt [47, 48]. Neben CTLA-4 kommt auch PD-1 (*programmed cell death 1*), einem weiteren Mitglied der B7/CD28-Familie, eine Rolle bei der Induktion von Anergie zu. PD-1 wird auf anergen T-Zellen exprimiert und bindet an die Rezeptoren PD-Ligand-1 und -2 (PD-L1, PD-L2) [49]. Die inhibitorische Wirkung führt zum Zellzyklusarrest und/oder hemmt die Zytokinproduktion [50, 51]. Ähnlich wie CTLA-4-defiziente Mäuse entwickeln auch PD-1-defiziente Mäuse Autoimmunphänomene [52] und Polymorphismen im humanen PD-1 Gen führen zu einer erhöhten Inzidenz von Autoimmunerkrankungen [53, 54].

Der effektivste Mechanismus Autoimmunreaktionen in der Peripherie zu verhindern ist die Deletion autoreaktiver T-Zellen durch den aktivierungsinduzierten Zelltod (*activation induced cell death*, AICD). Hierbei führt die Bindung von Fas (CD95 oder Apo-1) an den Fas-Liganden (FasL) über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Apoptose des Lymphozyten [55]. Fas wird nach Aktivierung von T-Zellen exprimiert und die Reaktivierung dieser Zellen kann zur Koexpression des FasL führen [56], wodurch Apoptose sowohl in derselben als auch in benachbarten Zellen ausgelöst werden kann. Die physiologische Relevanz des Fas-FasL

Signalweges zeigt sich darin, dass Defekte dieses Signalweges im Menschen zum autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) führen [57].

1.2.2.2 Extrinsische Toleranzmechanismen

Die aktive Kontrolle autoreaktiver Lymphozyten durch spezialisierte Zellen des peripheren Immunsystems wird unter dem Begriff extrinsische Toleranzmechanismen zusammengefasst. Zu diesen Zelltypen, die Suppressorzellen oder regulatorische Zellen genannt werden, gehören bestimmte Subpopulationen von T- und B-Zellen, aber auch dendritischen Zellen (zur Übersicht s. [58-63]). Die Strategien zur Kontrolle autoreaktiver Zellen sind unterschiedlich und abhängig vom jeweiligen regulatorischen Zelltyp. So sezernieren manche Zelltypen antiinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin 10 (IL-10) oder *transforming growth factor beta* (TGF- β), die letztendlich die Proliferation und Differenzierung autoaggressiver Zellen unterdrücken. So konnten z.B. IL-10 sezernierende B-Zellen identifiziert werden, die bei der Kontrolle von experimenteller autoimmuner Arthritis in Mäusen eine wichtige Rolle spielen [64]. Andere Zelltypen verfügen dagegen über zellkontaktabhängige Suppressionsmechanismen. Die funktionellen Eigenschaften von DCs hängen z.B. von ihrem Reifestatus ab. Während reife DCs die Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen stimulieren, induzieren unreife DCs unter *steady-state* Toleranz, indem sie durch eine reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle Anergie in autoreaktiven T-Zellen hervorrufen [65]. Eine spezielle DC-Population mit regulatorischem Potential, so genannte tolerogene DCs, konnte im Menschen identifiziert werden. Diese DCs zeichnen sich unter anderem durch die Expression des Enzyms IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) aus, das die Umsetzung von Tryptophan zum zelltoxischen Kynurenin katalysiert und somit die Proliferation von T-Zellen hemmt [66]. Eine besondere Rolle für die Erhaltung der peripheren Toleranz scheinen jedoch regulatorische T-Zellen zu spielen.

1.3 Regulatorische T-Zellen

Die Existenz von Suppressor-T-Zellen wurde in den frühen 1970er Jahren durch Gershon und Kondo postuliert [67]. Zahlreiche Beobachtungen in den 1970er und 80er Jahren unterstützten ihre Hypothese und man war der Meinung, dass Suppressorzellen ihre biologische Funktion durch die Produktion löslicher Faktoren ausüben [68]. Man vermutete, dass diese Suppressor-Moleküle in der Genregion I-J des MHC-Komplexes kodiert werden. Die molekularen Analysen des MHC-Komplexes in den 1980er Jahren zeigten jedoch, dass dieser Locus gar nicht existiert, so dass dieses Forschungsgebiet in Misskredit geriet und alle biologischen Befunde nach Beschreibung der Th1- und Th2-Zellen als Folge einer Immundeviation abgetan wurden.

Trotzdem wurden schon damals experimentelle Beweise für die Existenz von Suppressor-Zellen geliefert, die die Grundlage für die heutige Sicht von regulatorischen T-Zellen bilden. So führte die Entfernung des Thymus in neugeborenen Ratten und Mäusen zu Autoimmunerkrankungen [69, 70], die durch einen Transfer normaler T-Zellen, insbesondere $CD4^+$ T-Zellen, verhindert werden konnte [71, 72]. Als Ursache für diese Autoimmunreaktionen wurde damals ein Verlust von Suppressor-T-Zellen vermutet. Erst 1995 gelangen Sakaguchi und Kollegen entscheidende Fortschritte auf diesem Forschungsgebiet als sie nachweisen konnten, dass $CD4^+$ T-Zellen, die die α -Kette des IL-2R (CD25) konstitutiv exprimieren, für den adoptiv transferierbaren Schutz vor Autoimmunität in diesem Modell verantwortlich sind [73]. Aufgrund ihrer Entstehung im Thymus werden diese $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen auch natürliche regulatorische T-Zellen (Treg) genannt.

Das Interesse an regulatorischen T-Zellen hat in den letzten 12 Jahren stark zugenommen und mittlerweile wurden zahlreiche suppressive T-Zellsubpopulationen beschrieben. Unter anderem $CD8^+$ Suppressorzellen, die eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) verhindern können [74, 75]. Ferner konnte für bestimmte NKT-Zellen (Natürliche Killer T-Zellen) eine durch IL-10-vermittelte immunregulatorische Wirkung gezeigt werden [76], ebenso wie für $CD4^-CD8^-$ (*double negative*, DN) $TCR\alpha\beta^+$ T-Zellen. Diese DN T-Zellen scheinen in Mäusen sowohl bei der Selbsttoleranz als auch bei Immunreaktionen gegen Transplantate, Tumore und Infektionen von Bedeutung zu sein [77-79].

$CD4^+$ regulatorische T-Zellen nehmen jedoch eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und der Immunregulation ein. Man unterscheidet dabei sogenannte adaptive oder Antigen-induzierte regulatorische T-Zellen, zu denen die TGF β -produzierenden T-Helfer-3 (Th3) und die IL-10-produzierenden Typ-1-regulatorischen (Tr1) Zellen gehören, von natürlichen Treg-Zellen.

1.3.1 Adaptive regulatorische T-Zellen: Th3/Tr1

Adaptive regulatorische T-Zellen unterscheiden sich von natürlich vorkommenden Treg-Zellen in vielerlei Hinsicht: 1.) sie werden nicht im Thymus gebildet sondern in der Peripherie induziert, 2.) ihre suppressive Wirkung beruht vorwiegend auf der Produktion anti-inflammatorischer immunmodulierender Zytokine und 3.) sie exprimieren nicht FOXP3, einen funktionell bedeutenden Transkriptionsfaktor der $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen (s. 1.3.2.1). **Abb. 1-2** zeigt schematisch die bisher bekannten Populationen $CD4^+$ und $CD8^+$ regulatorischer T-Zellen.

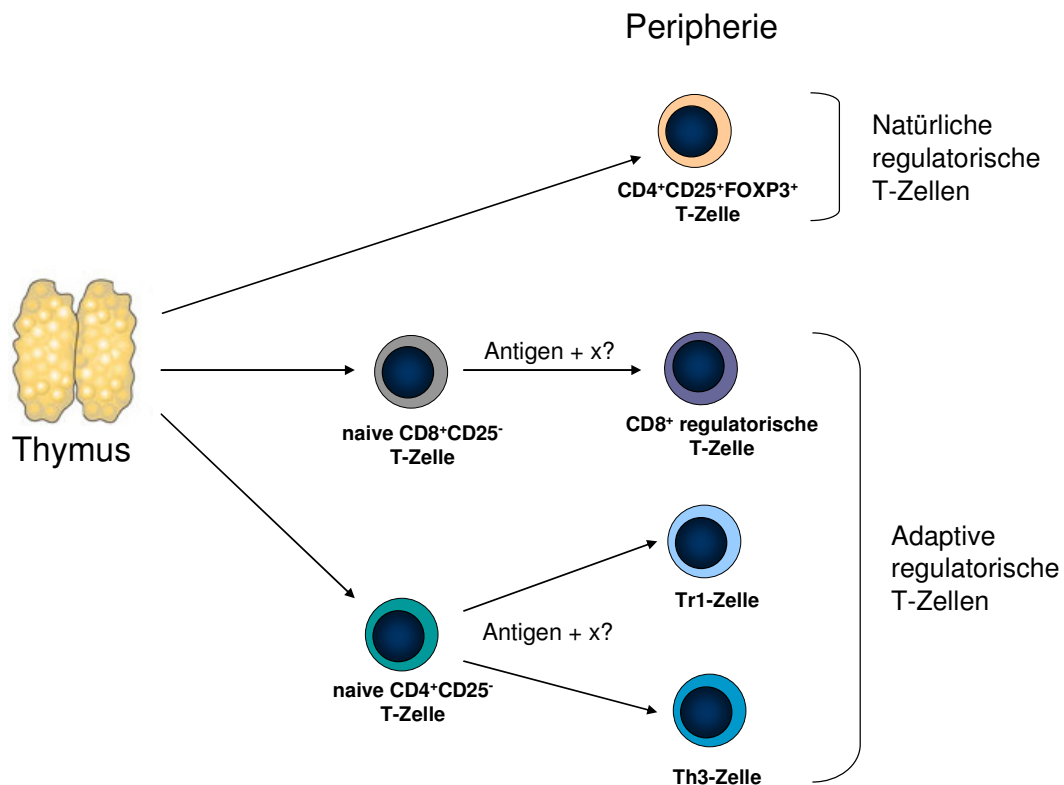


Abb. 1-2: Regulatorische T-Zellen.

Das Diagramm zeigt schematisch die bisher bekannten Hauptpopulationen von CD4⁺ oder CD8⁺ regulatorischen T-Zellen und ihren Ursprung. Th3 = T-Helfer-3 Zelle, Tr1 = Typ-1 regulatorische Zelle. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Übernommen in veränderter Form aus [80].

Th3-Zellen wurden zum ersten Mal im Zusammenhang mit oraler Toleranz beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass durch die orale Gabe geringer Mengen des *myelin basic protein* (MBP), ein Bestandteil der Myelinscheide von Nervenfasern, eine immunregulierende CD4⁺ T-Zellpopulation induziert wird, die durch Produktion und Sekretion von TGFβ das Auftreten einer EAE verhindert [81]. TGFβ-produzierende Th3-Zellen entstehen aus naiven CD4⁺ T-Zellen und können auch *in vitro* durch IL-4 und TGFβ induziert werden [82]. TGFβ hemmt sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung konventioneller T-Zellen (Tkonv) zu Th1- und Th2-Effektorzellen bzw. CTLs und fördert die Homöostase regulatorischer Zellen [83, 84].

Neben TGFβ ist auch IL-10 ein wichtiges immunmodulierendes Zytokin [85], das sowohl direkt als auch indirekt auf T-Zellen wirkt. IL-10 vermindert die Expression von kostimulatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen und MHC-II-Molekülen auf DCs [86-88], wodurch deren Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren herabgesetzt wird. Des Weiteren hemmt IL-10 die Zytokinproduktion von T-Zellen und Monozyten/Makrophagen und induziert Anergie in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [86, 89-91]. Dieser durch IL-10 hervorgerufene anerge Zustand soll – im Gegensatz zu IL-10-unabhängigen Anergiezuständen – durch die Gabe von IL-2 oder IL-15 nicht reversibel sein [91]. Die wiederholte TCR-Stimulation IL-10-anergisierter CD4⁺ T-

Zellen soll darüber hinaus zur Generierung von T-Zellen führen, die selbst große Mengen IL-10 und TGF β sezernieren, jedoch nur wenig IFN γ und IL-2 sowie kein IL-4. CD4⁺ T-Zellen mit diesem Zytokinprofil werden als Tr1-Zellen bezeichnet und können *in vitro* auch durch Vitamin D3 und Dexamethason induziert werden [92]. Tr1-Zellen supprimieren Th1- und Th2-vermittelte Immunantworten *in vitro* und *in vivo*, wo sie verletztes Gewebe zu infiltrieren scheinen und lokal durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen Entzündungsreaktionen und Gewebsschädigungen kontrollieren [62, 93]. In Mausmodellen verhindern Tr1-Zellen das Entstehen von EAE [92, 94] und autoimmunem Diabetes [95]. Des Weiteren werden sie mit der Toleranz gegen Transplantate in Verbindung gebracht, da diese mit einer erhöhten Produktion von IL-10 und TGF β einhergeht [96-101].

1.3.2 CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen

1.3.2.1 Entstehung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen

Der Thymus trägt durch die Bildung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen entscheidend zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz bei, was ihm neben der Fähigkeit positive und negative Selektion auszuüben eine dritte relevante Funktion verleiht [102].

Eine Vielzahl von Untersuchungen bewiesen, dass natürliche Treg-Zellen im Thymus gebildet werden und eine unabhängige CD4⁺ T-Zellpopulation mit suppressiver Funktion darstellen. So haben Nishizuka und Kollegen schon 1969 gezeigt, dass eine Thymektomie um Tag 3 nach Geburt zu massiven Autoimmunsyndromen führt. CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen werden verzögert aus dem Thymus exportiert und sind erst ab Tag 3 in der Peripherie zu finden. Ein Transfer von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus der Milz von adulten Tieren verhinderte die Entstehung von Autoimmunerkrankungen in neonatal thymektomierten Mäusen [103]. CD4⁺CD25⁺ Thymozyten besitzen alle phänotypischen und funktionellen Charakteristika peripherer CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen. Sie sind nach TCR-Stimulation *in vitro* anerg, verfügen über suppressive Aktivität und exprimieren neben CD25 die Treg-Zell-typischen Moleküle CTLA-4, GITR (*glucocorticoid induced tumor necrosis factor (TNF) receptor*) und FOXP3 (*forkhead box P3*) [104-107].

Die genauen Signalwege, die über die Differenzierung von T-Vorläuferzellen im Thymus in CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen oder konventionelle CD4⁺ T-Zellen entscheiden, sind noch nicht im Detail bekannt. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 scheint jedoch wesentlich an der Entwicklung von Treg-Zellen aus Thymozyten beteiligt zu sein [104, 108, 109]. Er wird daher auch als *lineage specification factor* oder *master regulator* bezeichnet. Brunkow und Kollegen identifizierten Foxp3 als neues Mitglied der *forkhead/winged-helix*-Familie von Transkriptionsfaktoren und zeigten, dass Mutationen im Foxp3-Gen für den Phänotyp von *scurfy*-Mäusen verantwortlich sind [110]. Diese spontane X-Chromosom-gebundene

Mutation führt in männlichen Tieren zu multiplen Autoimmunphänomenen, die mit einer massiven Proliferation von CD4⁺ T-Zellen mit Infiltration diverser Organe sowie einer Überproduktion proinflammatorischer Zytokine einhergehen und 16-25 Tage nach Geburt zum Tod führen [111]. Auch im Menschen rufen Mutationen im FOXP3-Gen ein schwerwiegendes Autoimmunsyndrom namens IPEX (*Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome*) hervor [112-115]. IPEX entwickelt sich innerhalb der ersten 5 Monate nach Geburt und führt zu multiplen Autoimmunerscheinungen, wie Typ-1 Diabetes mellitus, schwerer Enteropathie, generalisierten Ekzemen, hämolytischer Anämie, schwerer Diarrhö, Unterfunktion der Schilddrüse, Nahrungsmittelallergien und Entwicklungsstörungen und führt meist innerhalb von 2 Jahren zum Tod der Patienten. Nähere Untersuchungen zeigten, dass Foxp3 vorwiegend von peripheren CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Thymozyten exprimiert wird. Außerdem wurde beobachtet, dass *scurfy*- und *Foxp3-knock-out*-Mäuse einen ähnlichen Phänotyp ausprägen und beiden Mausmutanten Treg-Zellen fehlen [115, 119]. Darüber hinaus führt eine Transduktion konventioneller CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit dem Foxp3-Gen zur Konvertierung in Zellen mit regulatorischem Phänotyp und suppressiver Aktivität [118]. Diese Beobachtungen unterstreichen die enorme Relevanz von Foxp3 für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen.

Für die Reifung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen im Thymus scheint die Interaktion mit Peptid-MHC-II-Komplexen auf TEC wichtig zu sein. Unter Verwendung TCR-transgener (TCR-tg) Mausstämmen wurde gezeigt, dass Mäuse nur dann CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen ausbilden, wenn sie eine endogene TCR α -Kette exprimieren. Im Gegensatz dazu konnten TCR-tg Mäuse mit einem Defekt im *RAG2*^c-Gen (*Recombinase-activating gene 2*) keine CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen bilden. Somit scheint die Differenzierung der Treg-Zellen im Thymus unter anderem vom Umlagern endogener TCR-Gene abhängig zu sein [116]. Die Entscheidung im Thymus über die Differenzierung zu konventionellen oder regulatorischen CD4⁺ T-Zellen scheint von der Avidität des TCR für Autoantigene abzuhängen, da eine hohe Affinität für MHC-Selbst-Peptid vorliegen muss, um CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zu selektionieren [117-119]. Das Erkennen von Autoantigenen ist dabei aber nicht so stark, dass die T-Zelle über negative Selektion depletiert wird. Mit Hilfe von Mäusen, die MHC-II-Moleküle nur auf kortikalen Epithelzellen im Thymus exprimieren, konnte nachgewiesen werden, dass an der Positiv-Selektion von natürlichen Treg-Zellen vor allem cTECs beteiligt sind [120]. Darüber hinaus scheinen auch Interaktionen über kostimulatorische Moleküle, wie CD28/B7 [121] und CD40/CD40-Ligand [122] eine wichtige Rolle für die Entwicklung von Treg-Zellen im Thymus zu spielen.

^c **RAG** (Recombination-activating gene) 1 und 2 kodieren für die Proteine RAG-1 und -2, die an der Umlagerung und Rekombination von Immunglobulin- und TCR-Genen während der VDJ-Rekombination beteiligt sind – ein wichtiger Schritt bei der Reifung von B- und T-Zellen.

Neben der Bildung natürlicher Treg-Zellen im Thymus scheint es auch in der Peripherie zur Induktion von FOXP3⁺ Treg-Zellen zu kommen. So wurde durch die kontinuierliche Stimulation peptidspezifischer T-Zellen in TCR-tg Mäusen mit geringen Mengen des entsprechenden Antigens eine regulatorische T-Zellpopulation erzeugt, die ähnlich den CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen eine hohe Foxp3 Expression aufwies und die Proliferation und Zytokinproduktion konventioneller T-Zellen *in vivo* supprimieren konnte [123]. Ähnlich führte die Bindung von geringen Mengen Peptid an den monoklonalen Antikörper DEC205 zu einer verbesserten Prozessierung und Präsentation auf DCs und in der Folge zu einer Konversion naiver CD4⁺ T-Zellen zu Treg-Zellen [124]. Horwitz und Kollegen zeigten erstmals, dass CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen durch die Einwirkung von TGFβ induziert werden können [125]. Zahlreiche weitere Studien beschrieben eine solche Konversion naiver CD4⁺ T-Zellen nach TCR-Stimulation unter gleichzeitiger Gabe von TGFβ und IL-2 [126-129]. In Mäusen sind diese induzierten Treg-Zellen den Thymus-generierten Treg-Zellen bezüglich phänotypischer und funktioneller Eigenschaften sehr ähnlich und können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation von Tkonv-Zellen supprimieren [130-132]. Die Induktion von humanen Treg-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen durch TGFβ wird derzeit kontrovers diskutiert, da sich zwar eine FOXP3-Expression induzieren lässt, die funktionelle Aktivität dieser induzierten FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen aber fragwürdig erscheint [133, 134].

1.3.2.2 Phänotypische und funktionelle Eigenschaften von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen

Die Entdeckung, dass CD4⁺ T-Zellen, die CD25 konstitutiv exprimieren, stark suppressive Eigenschaften besitzen, ermöglichte erstmals die Charakterisierung einer definierten Suppressorpopulation [73]. Neben CD25 exprimieren natürliche Treg-Zellen konstitutiv CTLA-4 [105] und GITR [106]. Da diese Marker aber auch auf Tkonv-Zellen nach Aktivierung induziert werden, sind sie nur bedingt geeignet, die natürliche Treg-Zellpopulation eindeutig zu identifizieren. Weitere Aktivierungs-assoziierte Moleküle, die ebenfalls von Treg-Zellen exprimiert werden, sind OX40 (CD134) [135], LAG3 (*Lymphocyte-activation Gene 3*) [136], CD45RB^{low} und CD5 [63]. Die Suche nach spezifischeren Markern wurde durch Genexpressionsanalysen weiter vorangetrieben und einige Kandidaten, wie das Integrin αEβ7 (CD103) [137], Neuropilin-1 [138] und der G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPR) 83 [139] wurden beschrieben. Dennoch ist Foxp3 auch weiterhin als zuverlässigster linienspezifischer Marker anzusehen, da er fast ausschließlich in CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen exprimiert wird.

Trotz ihres „aktivierten“ Phänotyps sind natürliche Treg-Zellen *in vitro* nach TCR-Stimulation hyporesponsiv und produzieren kein IL-2 [140, 141]. Durch Gabe von exogenem IL-2 kann dieser anerge Zustand überwunden werden [142]. CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen sind nicht *per se* suppressiv, sondern müssen zur Gewinnung ihrer suppressiven Eigenschaften erst über ihren TCR stimuliert werden [143]. Danach können sie die Proliferation und

Zytokinproduktion von Tkonv-Zellen *in vitro* und *in vivo* supprimieren. Da die Aktivierung von natürlichen Treg-Zellen zwar antigenspezifisch ist, die Suppression dann jedoch antigen-unabhängig erfolgt, kann es hierbei zur *Bystander*-Suppression kommen [144]. Neben der suppressiven Wirkung auf CD4⁺ und CD8⁺ Tkonv-Zellen unterdrücken Treg-Zellen die Expansion, Immunglobulinproduktion und den Isotypwechsel von B-Zellen [145-147]. Darüber hinaus kann die zytotoxische Aktivität von NK- und NKT-Zellen sowie die Reifung und Funktion von DCs durch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen gehemmt werden [148-150]. Eine kürzlich publizierte Studie zeigt, dass CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen auch regulatorisch auf Mastzellen wirken [151].

1.3.2.3 Mechanismen der Suppression durch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen

Ursprünglich wurde erwartet, dass natürliche Treg-Zellen über einen einzigen dominanten und bisher noch nicht identifizierten zellkontaktabhängigen Suppressionsmechanismus ihre Funktion ausüben. Die große Zahl unterschiedlichster Zielzellen sowie die Vielzahl postulierter Suppressionsmechanismen (zur Übersicht siehe [152, 153]) weisen jedoch darauf hin, dass natürliche Treg-Zellen über ein Arsenal von Suppressionsmechanismen verfügen, die zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beitragen. *In vitro* ist die Suppression abhängig vom Zellkontakt zwischen Treg- und Tkonv-Zelle und wird nicht durch die Produktion inhibitorischer Zytokine vermittelt, da in Transwell-Experimenten keine suppressiven Wirkungen nachzuweisen waren [142, 143].

In vivo scheinen allerdings immunmodulierende Zytokine wie IL-10 und TGFβ bei der suppressiven Wirkung durch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen von Bedeutung zu sein. In einem Mausmodell für Atemwegsentzündungen führte der adoptive Transfer von Allergen-spezifischen CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zu einer verstärkten IL-10-Produktion in der Lunge und damit einhergehend zu einer reduzierten Symptomatik. Dieser Effekt konnte durch IL-10-Blockade aufgehoben werden [154]. Des Weiteren konnte in Mausmodellen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease*, IBD) gezeigt werden, dass die IL-10-Produktion durch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen essentiell für die Prävention der Kolitis ist [155]. Die Funktion von TGFβ bei der durch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen vermittelten Suppression wird kontrovers diskutiert, da TGFβ von vielen verschiedenen Zellen gebildet wird, Effekte auf eine Vielzahl von Zellen hat und in der Peripherie Treg-Zellen induzieren kann [156]. *In vitro* Untersuchungen mit TGFβ-neutralisierenden Antikörpern oder TGFβ-defizienten Treg-Zellen deuteten darauf hin, dass TGFβ für die suppressive Funktion natürlicher Treg-Zellen nicht benötigt wird [143, 157]. Im Gegensatz dazu weisen andere Studien auf die Bedeutung des von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen exprimierten membranständigen-TGFβ für die zellkontaktabhängige Suppression hin [148, 158, 159]. Auch *in vivo*

scheint die TGF β -Produktion und -Sekretion durch natürliche Treg-Zellen direkt an der Suppression von Tkonv-Zellen beteiligt zu sein [160-162]. Erst kürzlich wurde IL-35 als weiteres inhibitorisches Zytokin beschrieben, das ebenfalls an der suppressiven Wirkung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen beteiligt sein soll [163]. IL-35 wird konstitutiv von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen exprimiert und sezerniert. IL-35-defiziente Treg-Zellen zeigten eine reduzierte regulatorische Aktivität *in vitro* und waren nicht in der Lage, die homöostatische Proliferation von Tkonv-Zellen und die daraus resultierende IBD *in vivo* zu kontrollieren [163].

Ein weiterer Suppressionsmechanismus, der für CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen beschrieben wurde, ist die Lyse von Zielzellen. Genexpressionsdaten wiesen darauf hin, dass CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen nach Aktivierung vermehrt Granzym-B exprimieren [137] und es wurde beobachtet, dass natürliche Treg-Zellen durch einen zellkontaktabhängigen Granzym-B-vermittelten Mechanismus die Proliferation von CD4⁺ Tkonv-Zellen *in vitro* supprimieren [164]. Nachfolgend wurde die Granzym-B-vermittelte Lyse durch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen als Mechanismus ihrer suppressiven Wirkung sowohl für B-Zellen [165] als auch für NK-Zellen und CTLs beschrieben [166]. CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen scheinen allerdings auch alternative Wege zu nutzen, um in Zielzellen Apoptose zu induzieren. So wurde eine Beteiligung von TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*)/DR5 (*death receptor 5*) [167] sowie von Galectin-1, einem Mitglied der Familie von β -Galaktosid-bindenden Proteinen, bei der Suppression der Proliferation von Tkonv-Zellen beobachtet [168].

Störungen des Zellmetabolismus wurden als weiterer potentieller Mechanismus der durch Treg-Zellen vermittelten suppressiven Wirkung auf Zielzellen diskutiert. Eine zu diesem Thema schon lang existierende Hypothese beruht auf der hohen Expression der IL-2R α -Kette (CD25) auf natürlichen Treg-Zellen. So soll die Überexpression von CD25 zur kompetitiven Bindung von exogenem IL-2 führen, wodurch dieses Tkonv-Zellen der Umgebung für die Proliferation und Differenzierung nicht mehr zur Verfügung steht [169]. Durch den Entzug von IL-2 und anderer Zytokine soll Apoptose induziert werden [170]. Diese Art der Suppression scheint aber nicht der dominante Mechanismus zu sein, da IL-2R α -defiziente Treg-Zellen *in vitro* vergleichbare suppressive Aktivität haben wie Wildtyp (wt) Treg-Zellen [171, 172]. Besser belegt ist hingegen, dass natürliche Treg-Zellen zur selektiven Inhibition der endogenen IL-2 Transkription in Tkonv-Zellen führen [142, 173].

Kürzlich wurden weitere Suppressionsmechanismen beschrieben, die auf der Freisetzung intra- und extrazellulärer Adenosin Nukleosiden beruhen. Die Ektoenzyme CD39 und CD73 werden von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen exprimiert und katalysieren die Umsetzung extrazellulärer Nukleoside in perizelluläres Adenosin, das über die Bindung an den Adenosin-Rezeptor 2A auf aktivierten Tkonv-Zellen zur Suppression ihrer Effektorfunktionen führt [174-176]. Zudem wurde gezeigt, dass CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen Tkonv-

Zellen zellkontaktabhängig supprimieren können, indem sie cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*, zyklisches Adenosin-Monophosphat) über *gap junctions* der Zellmembran in aktivierte Effektorzellen transferieren. Ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel hemmt dann die Proliferation und IL-2 Produktion der Tkonv-Zellen [177].

Neben der durch Treg-Zellen direkt vermittelten Suppression von Tkonv-Zellen wurden auch indirekte Wirkungsweisen von natürlichen Treg-Zellen beschrieben. So konnte mit Hilfe der intravitalen Mikroskopie gezeigt werden, dass Treg-Zellen mit DCs interagieren, wodurch deren Fähigkeit zur Aktivierung von Tkonv-Zellen gemindert wird [178, 179]. Dabei scheint CTLA-4, das konstitutiv von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen exprimiert wird, eine wichtige Rolle zu spielen, da CTLA-4-blockierende Antikörper oder CTLA-4-defiziente Treg-Zellen die Wirkung auf DCs abschwächen [180, 181]. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in einem CTLA-4/B7-abhängigen Prozess DCs konditionieren IDO zu produzieren, welches wiederum die Effektorfunktion von Tkonv-Zellen supprimiert [182, 183]. Des Weiteren stellt auch die Veränderung der stimulatorischen Eigenschaften der DCs eine plausible Erklärung für die beobachteten Phänomene dar, da natürliche Treg-Zellen die Expression der kostimulatorischen Moleküle B7-1 und -2 auf DCs in einem CTLA-4-abhängigen Prozess herunterregulieren [184, 185]. Auch über das von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen exprimierte LAG-3 scheinen DCs moduliert zu werden. Bindung von LAG-3 an MHC-II-Moleküle auf reifen DCs aktiviert einen inhibitorischen Signalweg, der über ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) vermittelt wird und die Reifung und immunstimulatorische Fähigkeit von DCs hemmt [186]. Nach Interaktion mit natürlichen Treg-Zellen scheinen DCs darüber hinaus die Fähigkeit zu entwickeln, Tr1-ähnliche IL-10-produzierende T-Zellen zu induzieren [187]. Dieser Mechanismus wird als infektiöse Toleranz bezeichnet und wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet. Auch von membranständigem TGFβ wird vermutet, dass es zur infektiösen Toleranz beiträgt und weitere FOXP3⁺ Treg-Zellen aus Tkonv-Zellen induziert [134].

Die Vielzahl der beschriebenen Mechanismen verdeutlicht, dass die Aufklärung der Treg-vermittelten Suppression eine große Herausforderung für die aktuelle Forschung darstellt. Ziele dieser Bemühungen ist es unter anderem, therapeutische Strategien zur Behandlung diverser Erkrankungen zu entwickeln.

1.3.2.4 Die Rolle von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen bei Krankheiten

Trotz zahlreicher ungeklärter Fragen bezüglich der Biologie von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen gibt es keinen Zweifel, dass natürliche Treg-Zellen eine herausragende Rolle für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz einnehmen. Autoimmunerkrankungen werden bei etwa 5 % der westlichen Bevölkerung beobachtet, im Rahmen derer es zur Produktion von Autoantikörpern kommt sowie zur Reaktion von T-Zellen gegen autologe Zellen, Proteine

und Gewebe [188, 189]. Über die Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen ist noch wenig bekannt und zahlreiche Ursachen, wie etwa Umwelteinflüsse oder genetische Faktoren, werden diskutiert. Ein Ungleichgewicht zwischen $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen und autoreaktiven T-Zellen könnte zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen beitragen [63]. Wie erwähnt, führt eine Reduktion von $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen in der Peripherie oder das Verhindern ihrer Produktion im Thymus zu Autoimmunerkrankungen. Bei einigen Autoimmunerkrankungen des Menschen wurde eine verminderte Frequenz von $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen festgestellt [190, 191]. Des Weiteren zeigten $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit multipler Sklerose (MS), Typ-1 Diabetes (T1D), Psoriasis, Myasthenia gravis sowie rheumatoider Arthritis eine verminderte suppressive Aktivität [192-196]. IPEX entsteht durch Mutationen im FOXP3-Gen und geht mit einem Verlust natürlicher Treg-Zellen und schwerer Autoimmunität einher [115]. Außerdem wurden Polymorphismen im *il2ra*-Gen (CD25) mit MS und T1D in Verbindung gebracht [197, 198].

Während $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen vor Autoimmunerkrankungen schützen, scheinen sie bei Tumorerkrankungen die Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene zu behindern und somit das Wachstum des Tumors zu fördern. Durch Depletion von natürlichen Treg-Zellen mit anti-CD25 Antikörpern wurde die immunologische Tumorabstoßung in mehreren Krankheitsmodellen begünstigt [199-201]. Für die Tumorthherapie könnte die Manipulation von natürlichen Treg-Zellen (ergänzend zu etablierten Therapieverfahren) zukünftig eine wichtige Rolle spielen [202].

$CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen können Gewebeschäden durch überschießende Immunantworten verhindern, andererseits kann diese Immunmodulation auch die anti-infektiöse Immunität beeinflussen. So konnten in Mäusen, die mit dem Herpes simplex Virus (HSV) oder dem Parasiten *Schistosoma mansoni* infiziert wurden, krankheitsbedingte Gewebeschäden durch natürliche Treg-Zellen gemindert werden [203, 204]. Andererseits förderte die Suppression der überschießenden Immunantwort gegen diese Pathogene das Langzeit-Überleben der Erreger und begünstigte dadurch chronische Infektionen [205]. Ähnlich scheinen $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen auch zur HIV-Infektion beizutragen, da sie die Virus-spezifische Immunantwort unterdrücken und dadurch die virale Replikation begünstigen [206, 207]. Auch für Patienten mit chronischer Hepatitis B Infektion wurde einer erhöhte Frequenz von FOXP3⁺ Treg-Zellen im Blut und der Leber beschrieben [208]. Demnach spielen natürliche Treg-Zellen eine ambivalente Rolle bei Infektionen, da sie einerseits eine Immunpathologie verhindern und andererseits durch Suppression pathogen-spezifischer Immunantworten chronische Infektionen begünstigen.

1.4 Allogene Knochenmarktransplantation

Die allogene Knochenmarktransplantation (KMT) bzw. hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) wird als kuratives Therapieverfahren bei malignen und einigen nichtmalignen Erkrankungen eingesetzt. Dabei werden allogene Stammzellen auf einen Empfänger übertragen und die erkrankte Hämatopoese durch die rekonstituierte Spender-Hämatopoese ersetzt.

Um das Anwachsen der Stammzellen zu ermöglichen, wird im Rahmen der Konditionierung das Knochenmark des Spenders zerstört und das Empfängerimmunsystem unterdrückt, um eine Abstoßung des Transplantates zu verhindern. Klassische Konditionierungsverfahren sind die myeloablative Ganzkörperbestrahlung und/oder Hochdosis-Chemotherapie, in Kombination mit immunsupprimierenden Medikamenten. Bereits früh in der Entwicklung der allogenen HSCT wurde jedoch deutlich, dass die Myeloablation nicht das einzige therapeutische Prinzip darstellt, sondern dass immunologische Mechanismen – insbesondere kotransplantierte Spender-T-Zellen – erheblich zum Erfolg dieser Therapie beitragen [209]. So führte die Depletion der Spender-T-Zellen zu Transplantatabstoßungen, Reziden der malignen Grunderkrankung und einer verstärkten Anfälligkeit der Patienten für opportunistische Infektionen. Demnach üben Spender-T-Zellen bei der allogenen HSCT wichtige Funktionen aus: Sie fördern das Engraftment des Stammzelltransplantats, sie vermitteln dem Patienten nach Transplantation Immunität gegenüber Infektionen und sie eliminieren residuelle hämatopoetische Zellen des Empfängers, wodurch sie in Patienten mit maligner Erkrankung den gewünschten Graft-versus-Leukämie/Lymphom (GvL)-Effekt ausüben [210]. Andererseits sind Spender-T-Zellen auch Verursacher der Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD), einer Reaktion der Spender-T-Zellen gegen Empfängerorgane, die eine der Hauptkomplikationen nach allogener HSCT darstellt. Die ambivalente Rolle der Spender-T-Zellen bezüglich GvHD und GvL-Effekt ist in **Abb. 1-3** graphisch dargestellt.

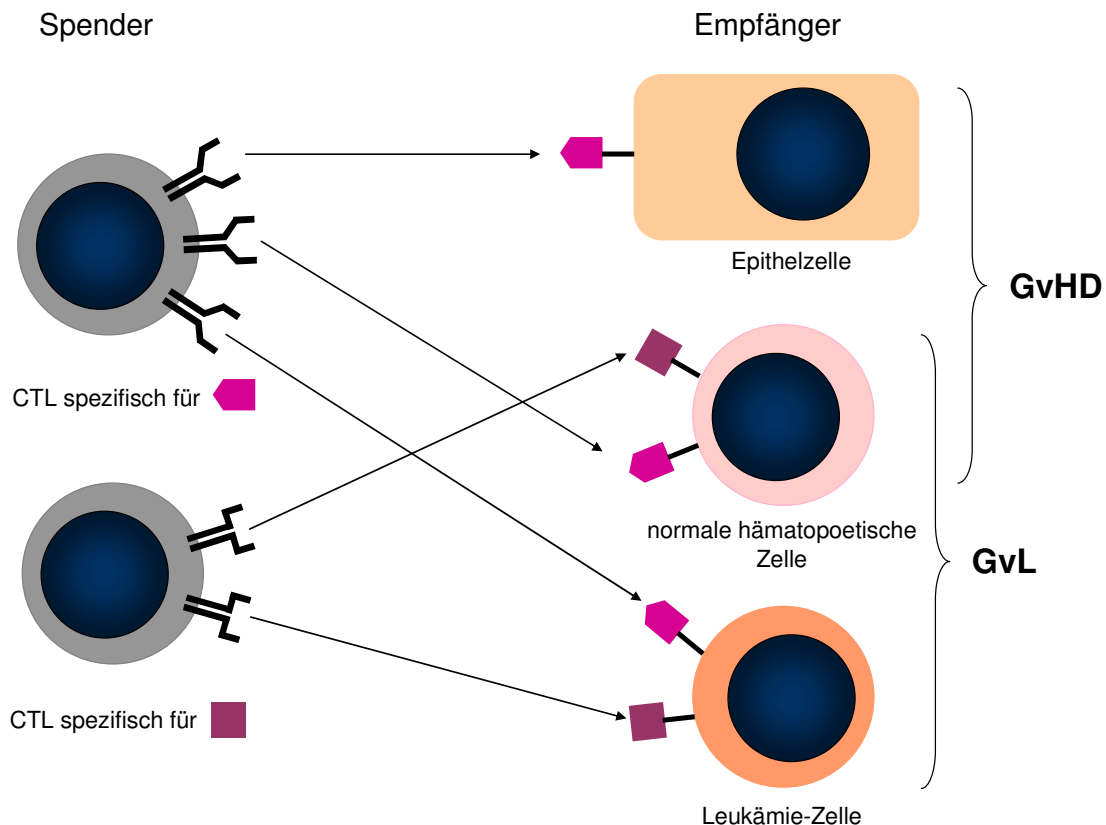


Abb. 1-3: Ambivalente Rolle der Spender-T-Zellen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) des Spenders erkennen sowohl Leukämiezellen als auch epitheliale und gesunde hämatopoetische Zellen des Empfängers aufgrund von Minorantigen-Spezifitäten als fremd. Dies führt sowohl zum kurativen GvL-Effekt als auch zu unerwünschter GvHD (nach [211]).

Die Gewebeverträglichkeit wird durch die Gene des MHC – im Menschen HLA (*human leucocyte antigen*)-System – bestimmt. Da die GvHD aufgrund einer Reaktion der Spender-T-Zellen gegen inkompatible HLAs oder darin gebundener Peptide (Minorhistokompatibilitätsantigene) entsteht, wurden mit der Entwicklung der HLA-Typisierung wichtige Fortschritte zur Vermeidung dieser Transplantationskomplikation erzielt. Da bisher jedoch kein Screening für Minorantigene zur Verfügung steht, ist die GvHD nach wie vor eine der Hauptkomplikationen nach allogener SCT

1.4.1 Die GvHD

Die Folgen der GvHD sind neben dem Rezidiv der malignen Grunderkrankung eine der Hauptursachen für die Morbidität und Mortalität nach allogener HSCT. Man unterscheidet eine akute Form, die sich in weniger als 100 Tagen nach Transplantation manifestiert, von einer chronischen Form, die erst nach mehr als 100 Tagen auftritt.

Die GvHD wird durch alloreaktive T-Zellen ausgelöst, die nach Transplantation eine Immunantwort gegen inkompatible MHC/HLA-Moleküle des Spendergewebes oder

Minorhistokompatibilitätsantigene ausbilden. Die Ausgangsfrequenz von T-Zellen die nicht-identen MHC-Moleküle erkennen ist sehr hoch, so dass bis zu 10 % der T-Zellen auf allogene HLA-Moleküle eines anderen Individuums reagieren können [212]. Man unterscheidet bei der Erkennung von Alloantigenen zwischen der direkten und der indirekten Erkennung [213]. Bei der direkten Erkennung reagiert der TCR der Spender-T-Zelle mit dem allogenen MHC-Komplex einer Empfänger-APC. Nach Konditionierung und erfolgter Transplantation sind im Empfänger sowohl konditionierungsresistente Empfänger- als auch Spender-APCs vorhanden. Bei der indirekten Erkennung reagiert die Spender-T-Zelle auf Empfänger-spezifische MHC-Peptide, die von Spender-APCs präsentiert werden. Die Beobachtung, dass GvH-Reaktionen auch in HLA-identen Zwillingspaaren ausgelöst werden können, führte zu der Entdeckung der so genannten Minorhistokompatibilitätsantigene (*minor histocompatibility antigens*, miHA) [214]. miHA sind polymorphe Proteine, die in Spender und Empfänger unterschiedlich exprimiert werden und nach Prozessierung durch Spender- oder Empfänger-APCs den T-Zellen über MHC-Moleküle präsentiert werden.

Nach derzeitigem Verständnis kann die Entstehung der GvHD als mehrstufiger Prozess betrachtet werden (zur Übersicht siehe [215, 216]), der in **Abb. 1-4** schematisch dargestellt ist.

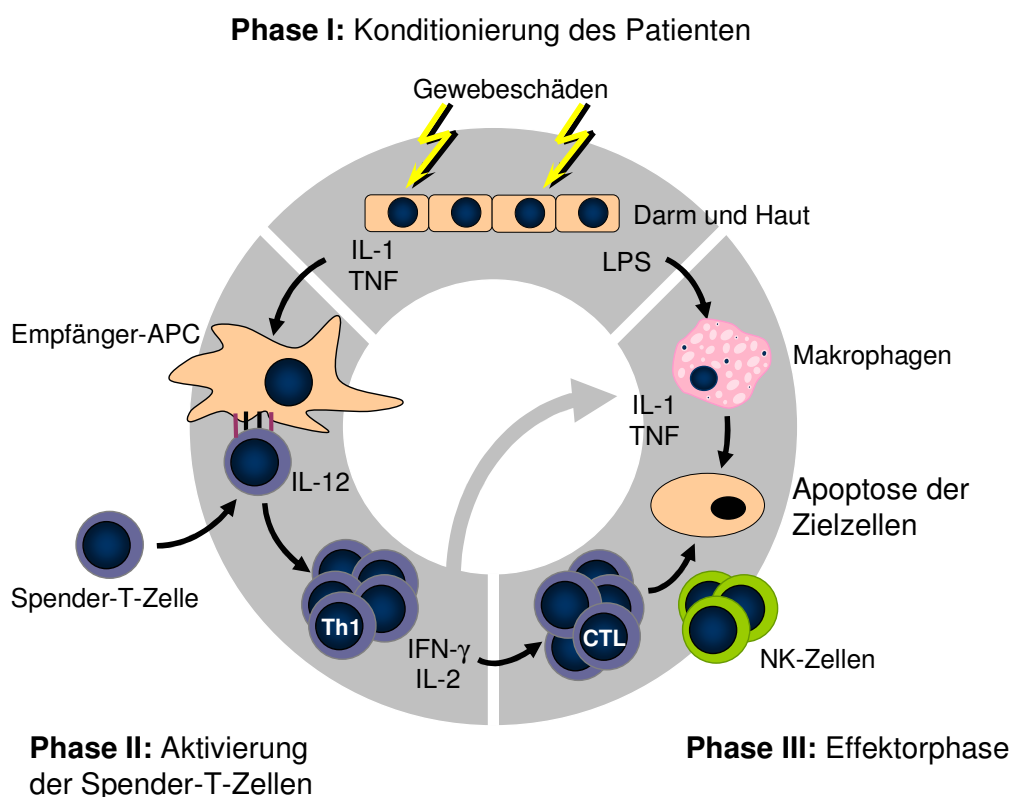


Abb. 1-4: Pathophysiologie der akuten GvHD.

Die Entstehung der akuten GvHD ist in 3 Phasen unterteilt. Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert nach [217].

In der ersten Phase führt die Konditionierung des Patienten zu Gewebeschäden, wodurch proinflammatorische Zytokine (wie z.B. IL-1 und TNF) durch aktivierte Empfängerzellen produziert werden [218]. Dadurch werden Empfänger-APCs aktiviert, so dass verstärkt Adhäsionsmoleküle, kostimulatorische Moleküle und MHC-Moleküle exprimiert werden [217]. Schädigungen der Mukosa des Darmtraktes führen zur Einschwemmung von bakteriellem LPS, das ebenso zur Aktivierung der Empfänger-APCs beiträgt. Nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine und LPS reifen DCs zu immunstimulatorischen DCs heran [219]. Transplantierte Spender-T-Zellen migrieren in sekundäre lymphatische Organe und werden in diesem proinflammatorischem Milieu durch Spender-APCs aktiviert. Die aktivierten T-Zellen expandieren, differenzieren zu Effektorzellen und verlassen das lymphatische Gewebe, um in typische Zielorgane, wie Darm, Haut und Leber zu migrieren [220]. In dieser Effektor-Phase kommt es zu einer komplexen Kaskade aus zellulären und inflammatorischen Prozessen. Die von aktivierten T-Zellen sezernierten Zytokine (z.B. IL-2 und IFN γ) aktivieren hierbei weitere Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems, wodurch die Gewebeeinflammation und zytotoxische Gewebeschädigung durch CTLs und NK-Zellen weiter vorangetrieben wird.

Aufgrund der ambivalenten Rolle von Spender-T-Zellen ist es ein zentrales Ziel der Transplantationsforschung, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die einerseits das Entstehen der GvHD verhindern ohne die vorteilhaften T-Zell-Wirkungen (z.B. GvL) zu blockieren.

1.4.2 Die Rolle von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen bei der GvHD

Die immunsuppressive Wirkung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen auf autoreaktive T-Zellen hat die Leiter unserer AG (Prof. Dr. Edinger und Dr. Hoffmann) frühzeitig dazu veranlasst, ihre Bedeutung in Modellen der allogenen KMT zu untersuchen. Sie konnten zeigen, dass CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in einer gemischten Leukozyten-Reaktion (*mixed leucocyte reaction*, MLR) die Proliferation alloreaktiver Tkonv-Zellen unterdrücken. Daraufhin wurde ihre immunregulierende Wirkung in Mausmodellen der akuten GvHD untersucht [221]. Die akute GvHD wurde in diesen Mäusen durch einen Transfer von Tkonv-Zellen induziert. Die Kotransplantation CD4⁺CD25⁺ Spender-Treg-Zellen mit CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen im ausgeglichenen Verhältnis (1:1) schützte die Tiere vor letaler GvHD. Dieser protektive Effekt führte zu einer mildereren GvHD-Symptomatik, geringeren Schäden in Darm und Haut sowie zu einem symptomfreien Langzeit-Überleben von 93 % der Empfängertiere im Vergleich zu 0 % Langzeitüberleben der GvHD-Gruppe [221]. Eine Analyse der Tkonv-Zellen aus diversen Organen ergab, dass nach adoptivem Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen die Anzahl der Tkonv-Zellen stark reduziert war [222, 223]. Somit scheinen CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen die GvH-Reaktion zu kontrollieren, indem sie die frühe Expansion alloreaktiver T-Zellen

hemmen. Ähnliche Ergebnisse wurden mittlerweile auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [224, 225]. Die Fähigkeit von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen GvHD zu verhindern führte zwangsläufig zu der Frage, inwieweit auch die vorteilhaften Effekte der Spender-T-Zellen beeinflusst werden. Prof. Edinger und Kollegen konnten in murinen Tumormodellen nachweisen, dass der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen die GvHD verhindert, ohne dabei den gewünschten GvL-Effekt der Spender-T-Zellen abzuschwächen [222]. Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen auch das Engraftment des Stammzelltransplantats nicht behindern, sondern die hämatopoetische Rekonstitution eher fördern [226-228]. Humane Treg-Zellen unterdrücken die Alloreaktion konventioneller T-Zellen *in vitro* ebenso wie murine Zellen. [229, 230]. Die phänotypischen und funktionellen Ähnlichkeiten humaner und muriner Treg-Zellen lassen erwarten, dass der adoptive Treg-Zell-Transfer auch im Menschen prophylaktisch oder therapeutisch sinnvoll sein könnte. Klinische Daten von GvHD-Patienten zeigen, dass die akute GvHD mit einer reduzierten Zahl natürlicher Treg-Zellen verbunden ist und dass die Frequenz der Treg-Zellen im Spender mit dem Schweregrad und der Inzidenz der GvHD invers korreliert [231, 232]. Aufgrund der geringen Zahl humaner natürlicher Treg-Zellen im PB ist für zukünftige therapeutische Anwendungen voraussichtlich ihre *in vitro* Expansion erforderlich. Ein Schwerpunkt der Arbeiten unserer Gruppe ist die Entwicklung von Strategien zur Isolierung und Expansion humaner natürlicher Treg-Zellen für klinische Zwecke.

Die Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften humaner Treg-Zellen war bislang auf *in vitro* Systeme beschränkt, welchen jedoch die Komplexität des lebenden Organismus fehlen. Die Untersuchung humaner Treg-Zell-Funktionen in GvHD-relevanten *in vivo* Modellen wäre deshalb ein entscheidender Fortschritt. In den letzten Jahren wurden neue immundefiziente Mausstämmen hergestellt, die durch kombinierte Defekte des RAG2 Gens und der gemeinsamen γ -Kette von Zytokinrezeptoren humane Zellen kaum abstoßen. In diesen Mäusen (RAG2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäuse) kann durch Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eine humane Hämatopoese inklusive eines funktionellen lymphozytären Systems etabliert werden, weshalb solche Modelle für klinische Fragestellungen zunehmend genutzt werden. [233]. In einer Studie von van Rijn und Kollegen wurde beschrieben, dass die Transplantation humaner PBMCs in RAG2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäuse zur Entwicklung einer xenogenen Erkrankung führt, die der GvHD im Menschen ähnelt [234], weshalb dieses Modell zur Evaluation neuer Therapiestrategien geeignet sei. Basierend auf diesen Daten sollte das Modell nun zur präklinischen Untersuchung humaner Treg-Zellen eingesetzt werden.

2 Zielsetzung

In murinen Modellen der allogenen KMT schützt der adoptive Transfer von natürlichen CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen vor letaler GvHD. Die phänotypischen und funktionellen Ähnlichkeiten muriner und humaner Treg-Zellen lassen erwarten, dass humane Treg-Zellen zur Vermeidung und/oder Therapie der GvHD eingesetzt werden könnten. Aufgrund der geringen Frequenz humaner Treg-Zellen im peripheren Blut ist ihre *in vitro* Expansion eine wichtige Voraussetzung für zelltherapeutische Strategien. In unserer Arbeitsgruppe wurden Protokolle zur zuverlässigen Isolierung und effizienten *in vitro* Expansion humaner Treg-Zellen entwickelt [235, 236]. Für potentielle klinische Anwendungen *in vitro* expandierter Treg-Zellen ist der Erhalt ihrer funktionellen Eigenschaften nach Expansion von entscheidender Bedeutung. Daher ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, humane natürliche Treg-Zellen vor und nach Expansion funktionell und phänotypisch zu charakterisieren und *in vitro* expandierte Treg-Zellen im xenogenen GvHD-Modell bezüglich ihrer protektiven Wirkung zu untersuchen.

Für die Entwicklung und Funktion natürlicher Treg-Zellen ist der Transkriptionsfaktor FOXP3 essentiell und seine Expression ist der zuverlässigste Marker für die Identifizierung dieser Zellpopulation. Deshalb soll als Qualitätskriterium die FOXP3-Expression humaner Treg-Zellen vor und nach Expansion analysiert werden. Hierdurch sollen ideale Ausgangspopulationen für die Expansion von Treg-Zellen identifiziert und optimierte Isolierungsstrategien entwickelt werden. Sollten auf diese Weise verbesserte Treg-Zell-Produkte generiert werden können, sollen sie vergleichend *in vitro*, vor allem aber auch in einem xenogenen Transplantationsmodell *in vivo* funktionell getestet werden. Hierfür wird ein von van Rijn und Kollegen beschriebenes Modell eingesetzt, das der GvHD im Menschen ähnelt und zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen geeignet sein soll. Zum Vergleich werden tierexperimentelle Studien im allogenen Transplantationsmodell durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen somit zur besseren Charakterisierung humaner Treg-Zellen beitragen und die Voraussetzungen schaffen für eine prophylaktische oder therapeutische Anwendung *in vitro* expandierter Treg-Zellen in Transplantationspatienten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
ECL Filme Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Costar, Cambridge, USA
Filterspitzen	Ratiolab, Dreieich
Gel Blotting Papier GB003	Schleicher und Schuell, Dassel
Kanülen (0,4, 0,6, 0,9, 1,2 mm)	BD, Heidelberg
Kombitips	Eppendorff, Hamburg
Kryoröhrchen	Corning Incorporated, NY
MACS Separationssäulen (MS, LS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Nitrocellulose-Membran (Poren 0,45 µm) Protran BA85	Schleicher und Schuell, Dassel
Objektträger superfrost	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipettenspitzen	Eppendorff, Hamburg
Polypropylenröhrchen (15, 50, 250 ml)	BD Falcon™, Heidelberg
Polystyrolröhrchen (4 und 12 ml)	BD Falcon™, Heidelberg
Reagiergefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorff, Hamburg/Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (1, 5, 10, 20, 50ml)	BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 und 75cm ²)	Corning Incorporated, NY
Zellkulturplatten (6, 24 und 96 Vertiefungen)	BD Falcon™, Heidelberg
Zellkulturschalen	BD Falcon™, Heidelberg
Zellsiebe	BD Falcon™, Heidelberg

3.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav Varioklav 75SCompact	H + P, Oberschleißheim
Blot-Apparatur Standard Powerpack P25	Whatman Biometra, Göttingen
Brutschränke Hera Cell 240, BBD6220	Heraeus, Hanau
Bestrahlungsgerät für Mäuse Primus 2	Siemens

Bestrahlungsgerät für Zellen IBL437C	CISbio International, Gif-Sur-Yvette F
FACSCalibur	BD, San Jose
FACSAria	BD, San Jose
FACS LSR II	BD, San Jose
Heizblock HBT-2131	Haep Labor Consult, Bovenden
LightCycler II	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetseparator MPC™-6	Invitrogen/Dynal, Oslo
Mikroskop ID03	Zeiss, Oberkochen
Rotor Sample Mixer	Invitrogen/Dynal, Oslo
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilwerkbänke HS18, KS15	Heraeus, Hanau
Thermocycler PTC-200	MJI Research, Waltham
Vortex Genie2	Scientific Industries, NY
Waage L1200S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 6K15	Sigma, Osterode
Zentrifuge Mikro200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Palo Alto

3.1.3 Medien, Puffer, Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden folgende Lösungen, Puffer und Medien verwendet:

Lösungen	Hersteller/Herstellung
AB-Serum, human	Flebogamma, Grifols, Langen
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung 30 %	Roth, Karlsruhe
Anodenpuffer A	36.3 g Tris pH 10.4 (0.3 M) 200 mL Methanol (20 %) ad 1000 mL aqua bidest.
Anodenpuffer B	3.03 g Tris pH 10.4 (25 mM) 200 mL Methanol (20 %) ad 1000 mL aqua bidest.
Anodenpuffer C	5.20 g ε-Amino-n-Caprinsäure pH 7.6 200 mL Methanol (20 %)

	ad 1000 mL aqua bidest.
Ammoniumpersulfat 10 %	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Blockierungs-Lösung	5g Magermilchpulver (5 %) 100 mL 1x TBS-Tween
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO, 99,7%)	Sigma, München
EDTA-Entkalkungslösung	250g Titriplex III ad 200ml mit aqua bidest unter Rühren auf Heizplatte aufschlemmen + 50 ml NaOH (40 %) ad 800ml mit aqua bidest pH mit NaOH (40%) auf 7,4 einstellen ad 1000ml aqua bidest
Einfriermedium	90 % FCS + 10 % DMSO
Erythrozyten-Lysepuffer (pH = 7,4)	0,155 M NH_4Cl , 0,1 M KHCO_3 , und 0,1 mM EDTA ad aqua bid.
FACS-Clean	BD, Heidelberg
FACS-Flow	BD, Heidelberg
FACS-Rinse	BD, Heidelberg
FACS-Puffer	PBS + 2 % FCS
Fixierungs- und Permeabilisierungskit	BD, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
FOXP3 Färbekit	eBiosciences, SanDiego
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Heparin 5000 U/ml (Liquemin® N25000)	Roche, Basel
Komplettes RPMI 1640-Medium (cRPMI)	+ 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 1 % NEA, 0,05mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Na-Pyruvat, 10 mM HEPES und 2 ml MEM-Vitamine
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)	15 g Tris (40mM) 216 g Glycin (0.95 M) 15 g SDS (0.5 %) ad 3000 mL aqua bidest.
Lymphozytenseparationslösung Ficoll	Pharmacia, Freiburg

MACS-Puffer	PBS + 2 mmol EDTA, 1 % FCS
Obergelpuffer	30 g Tris/HCl pH 6.8 (0,5 M) ad 500 mL aqua bidest.
PBS (Phosphate buffered saline):	PAA, Pasching
Rekombinantes humanes IL-2 Proleukin®	Chiron, Tuttlingen
RPMI 1640-Medium	Lonza, Basel
Sammelgelpuffer	90,83 g Tris/HCl pH 8.8 (1,5 M) ad 500 mL aqua bidest.
SDS	Roth, Karlsruhe
SDS-Lysepuffer	10 mL Glycerin (20 %) 5 mL TrisPuffer 1.25 M (125 mM) 2 g SDS (4 %) 5 mL 2-Mercaptoethanol 14.4 M (10 %) 10 mg Bromphenolblau (0.02 %) ad 50 mL aqua bidest.
Tris	Roth, Karlsruhe
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
1 x TBS-Tween (0,1 %)	1 mL Tween-20 (0.1 %) ad 1000 mL TBS (1x)
10 mg/ml Penicillin/0,85% Streptomycin	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
100 mM Natriumpyruvat	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
1M HEPES	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
100x NEAA	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
2 x TBS	9.16 g Tris/HCl pH7.4 (20 mM) 35.1 g NaCl (150 mM) ad 2000 mL aqua bidest.
200 mM Glutamin	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe
50 mM 2-Mercaptoethanol	GibcoBRL Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

	Hersteller
RNA 6000 Nano LabChip® Kit	Agilent Technologies, Palo Alto
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy micro Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR green	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
RNasin	Promega, Mannheim

3.1.5 Farbstoffe und Stimulanzen

	Hersteller
CFSE	Fluka Sigma, München
Propidiumiodid	Fluka Sigma, München
Ionomycin	Sigma, München
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma, München
anti-Human-CD28 (CD28.2)	BD, Heidelberg
anti-Human-CD3 (OKT3)	Janssen-Cilag, Neuss
CD3/CD28 T-Zell-Expansions- <i>beads</i> (<i>T Cell Expander</i> , TCE Dynabeads®)	Invitrogen/Dynal, Oslo

3.1.6 Antikörper

Für den Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Markern wurden folgende fluorochrommarkierte monoklonale Antikörper verwendet:

Anti-Maus-Antikörper

Spezifität	Klon	Konjugation	Hersteller
anti-B220	16A	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD3	145-2C11	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD4	L3T4	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD4	L3T4	PE	BD, Heidelberg
anti-CD4	L3T4	PerCP	BD, Heidelberg
anti-CD8	Ly-2	APC	BD, Heidelberg

anti-CD11b	M1/70	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD19	1D3	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD19	6D5	PE	BD, Heidelberg
anti-CD25	PC61	PE	BD, Heidelberg
anti-CD45	30-F11	PE	BD, Heidelberg
anti-TCRb	H57-597	APC	BD, Heidelberg
anti-TER-119	TER-119	APC	Biolegend, SanDiego
anti-CD16/32	93	unkonjugiert	Biolegend, SanDiego
anti-H-2K ^b	AF6-88.5	PE	BD
anti-H-2K ^d	AF6-88.5	FITC	BD
anti-F4/80	F4/80	PE	Caltag
anti-Gr-1	RB6-8C5	APC	Biolegend, SanDiego

Anti-Human-Antikörper

Spezifität	Klon	Konjugation	Hersteller
anti-CCR7	150503	FITC	R&D Systems, Abingdon
anti-CD3	SK7	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD3	SK7	PerCP	BD, Heidelberg
anti-CD3	UCHT1	APC	BD Pharmingen TM , Heidelberg
anti-CD4	SK3	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD4	SK3	PE	BD, Heidelberg
anti-CD4	SK3	PerCP	BD, Heidelberg
anti-CD4	SK3	APC	BD, Heidelberg
anti-CD8	SK1	PE	BD, Heidelberg
anti-CD8	SK1	APC	BD, Heidelberg
anti-CD14	MΦP9	PE	BD, Heidelberg
anti-CD19	4G7	FITC	BD, Heidelberg
anti-CD19	4G7	PE	BD, Heidelberg
anti-CD25	2A3	PE	BD, Heidelberg
anti-CD25	2A3	APC	BD, Heidelberg
anti-CD45	HI30	FITC	BD Pharmingen TM , Heidelberg
anti-CD45	2P1	PerCP	BD, Heidelberg
anti-CD45RA	HI100	FITC	BD Pharmingen TM , Heidelberg
anti-CD45RA	HI100	PE	BD Pharmingen TM , Heidelberg
anti-CD45RA	MEM-56	APC	Caltag, Hamburg

anti-CD45RO	UCHL1	FITC	BD Pharmingen™, Heidelberg
anti-CD45RO	UCHL1	PE	BD Pharmingen™, Heidelberg
anti-CD56	555516	PE	BD Pharmingen™, Heidelberg
anti-CD62L	DREG-56	APC	BD, Heidelberg
anti-CTLA-4	BNI3	PE	BD, Heidelberg
anti-FOXP3	PCH101	PE	eBioscience, SanDiego
anti-FOXP3	PCH101	APC	eBioscience, SanDiego
anti-IFN γ	B27	FITC	BD, Heidelberg
anti-IL-2	MQ1-17H12	APC	BD, Heidelberg
anti-IL-2	MQ1-17H12	PE	BD, Heidelberg

3.1.7 *beads*

Spezifität	Hersteller
anti-PE- <i>beads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Maus-CD4- <i>beads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Maus-CD90- <i>beads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Human-CD4- <i>beads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Human-CD8- <i>beads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Human-CD2PanT-Dynabeads®	Invitrogen/Dynal, Oslo

3.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe der Primer 3 Software® (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) selbst *designed* und von der Firma Metabion in Martinsried hergestellt. Die Schmelztemperatur (*Annealing*-Temperatur) der Primer betrug ~ 60°C. (F: *Forward*, R: *Reverse*).

Name	Sequenz (5' → 3')
CD4 F	ATGTGGCAGTGTCTGCTGAG
CD4 R	GATGCCTAGCCCAATGAAAA
β 2M F	GTGCTCGCGCTACTCTCTCT
β 2M R	TCTCTGCTGGATGACGTGAG
18S F	ACCGATTGGATGGTTTAGTGAG
18S R	CCTACGGAAACCTTGTTACGAC
FOXP3 F [237]	GAAACAGCACATTCCCAGAGTTC

FOXP3 R	ATGGCCCAGCGGATGAG
GAPDH F [237]	CCACATCGCTCAGACACCAT
GAPDH R	GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT

3.1.9 Software und Internetdienste

Folgende Software und Internetdienste wurde während der Arbeit benutzt

Software	Hersteller/Adresse
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/
Pubmed Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
FlowJo	Treestar, San Carlos
SPSS Statistics15.0	SPSS, Chicago
Microsoft Office	Microsoft, Redmont
Sigma Plot	Systat Software GmbH, Erkrath
BD FACS Diva	BD, San Jose
FCAP Array Software	BD, San Jose
MegaBLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

3.1.10 Versuchstiere

Mausstamm	Herkunft
C57BL/6	Charles River, Sulzfeld
BALB/c	Charles River, Sulzfeld
RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-d}	Eigenzucht

3.1.11 Primäre Zellen und Zelllinien

Primäre Zellen

Primäre Zellen für T-Zellkulturen oder xenogene Transplantationen wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von Leukapherisaten gesunder Spender gewonnen. Die Leukapherese wurde nach Aufklärung und Einwilligung der Spender in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikum Regensburg nach einem behördlich genehmigten Protokoll durchgeführt.

^d im Einverständnis von Mamuro Ito (MTA, *material transfer agreement*) aus einer Auftragszucht von Charles River (Italien) bezogen

CD32⁺ L-Zellen

Diese Mausfibroblasten-Zelllinie wurde mit dem Gen des humanen Fcγ-Rezeptor II (CD32) transfiziert [238]. Durch die Expression von CD32 an der Oberfläche können humane Immunglobuline (IgG) gebunden werden. Nach Zugabe von humanen anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern wurden CD32⁺ L-Zellen zur polyklonalen Aktivierung in der T-Zellkultur eingesetzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden Zellen in einer Lösung von 0,16 % Trypanblau (Gibco) in 0,9 % NaCl (Merck) in PBS verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops ausgezählt. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, da aufgrund fehlender Membranintegrität nur abgestorbene Zellen eine Blaufärbung aufweisen. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{Zellzahl}$$

Die Zellzahl von Zellsuspensionen, die potentiell noch Erythrozyten enthielten, wurden in Türks-Lösung bestimmt. Die Erythrozyten werden durch die in Türks-Lösung enthaltene Essigsäure hämolysiert und Leukozyten werden durch das enthaltene Trypanblau lebend-tot diskriminiert.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen werden in einer Dichte von 30×10^6 Zellen/ml Einfriermedium eingefroren. Dazu werden die Zellen gezählt, in PBS gewaschen und in reinem vorgekühltem FCS in einer Dichte von 60×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Anschließend wird die Zellsuspension mit vorgekühltem FCS/20 % DMSO auf das Endvolumen von 30×10^6 Zellen/ml aufgefüllt und zügig in gekühlte Einfrierröhrchen abgefüllt (maximal 1,5 ml pro Einfrierröhrchen). Die befüllten Einfrierröhrchen werden in eine 4 °C kühle Kryobox (Nalgene Nunc, International Hereford, U.K.) gestellt und für einige Tage bei -80 °C gelagert. Die mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen gewährleisten ein definiertes Abkühlen der Zellen um -1 °C/ml pro min. Danach werden die Zellen in flüssigem N₂ gelagert.

3.2.1.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff rasch in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und sofort nach dem Auftauen in warmes RPMI-Medium (10 % FCS) aufgenommen, abzentrifugiert (1200 rpm/10 min/4 °C) und je nach Zellzahl in 25 bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und üN im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, ≥ 90 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

3.2.1.4 Dichtegradientenzentrifugation

Die verwendeten Zellen wurden durch Leukapherese (Blutzellseparator CS 3000 plus, Baxter) von gesunden Spendern gewonnen. Dabei wurde das Blut in eine erythrozytenreiche Fraktion, die den Spendern zurückgegeben wurde, sowie eine erythrozytenarme Fraktion aufgetrennt. Letztere Fraktion wurde anschließend mit PBS 1:1 verdünnt und auf eine Lymphozytenseparations-Lösung (Ficoll/Hypaque) aufgetragen. Nach 20-minütiger Zentrifugation (2300 rpm/20 °C) hatte sich das Leukapherisat in eine schwere Fraktion (Erythrozyten), eine Interphase (mononukleäre Zellen, MNC) und den Überstand (Thrombozyten) getrennt. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgenommen und in PBS gewaschen (1400 rpm/10 min/20 °C). Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Zellen gezählt und entweder eingefroren oder zur Gewinnung von T-Zellen verwendet.

3.2.1.5 Antikörperfärbung

3.2.1.5.1 Oberflächenfärbung

In der Regel wurden 1 x 10⁶ Zellen pro FACS-Ansatz verwendet. Die Zellen wurden in FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (1200 rpm/6 min/4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen durch Fc-Rezeptortragende Zellen wurden im Falle von Mauszellen muriner Fc-Block (anti-CD16/CD32), im Falle von humanen Zellen 10 % AB-Serum oder im Falle von xenogen transplantierten Mäusen eine Kombination aus beidem verwendet. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C wurden gemäß den Herstellerangaben oder eigenen Titrationsen Fluorochrom-markierte Antikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Röhrchen mit FACS-Puffer aufgefüllt, die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm/6 min/4 °C), in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.5.2 Intranukleärfärbung für FOXP3

In der Regel wurden 1 x 10⁶ Zellen pro FACS-Ansatz verwendet. Die Zellen wurden in FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (1200 rpm/6 min/4 °C) und in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach einer direkten Antikörperfärbung der Oberflächenmoleküle wurden die

Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 1000 µl Fixierungs/Permeabilisierungs-Puffer (eBioscience, SanDiego) für 30 min bei 4 °C fixiert. Die permeabilisierten Zellen wurden 1 x mit FACS-Puffer und 2 x mit Permeabilisierungs-Puffer (eBioscience, SanDiego) gewaschen und anschließend mit 2 % Rattenserum für 15 min bei 4 °C blockiert. Für die Intranukleärfärbung wurde der anti-FOXP3-Antikörper ohne vorherigen Waschriff direkt zur Zellsuspension gegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 2 x mit Permeabilisierungs-Puffer und 1 x mit FACS-Puffer gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und im FACSCalibur durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.5.3 Intrazellulärfärbung für Zytokine

Das Prinzip der Intrazellulärfärbung der Zytokine dient zum Nachweis funktionell aktiver Lymphozyten. Hierfür werden die Zellen *in vitro* stimuliert und die Zytokinsekretion durch Zugabe der Sekretionshemmer Brefeldin A oder Monensin inhibiert. Nach der Oberflächenfärbung (optional) erfolgt die Fixierung mit nachfolgender Permeabilisierung der Zellen, die die intrazelluläre Färbung der akkumulierten Zytokine ermöglicht. Hierdurch können zeitgleich Phänotyp und funktionelle Aktivität unterschiedlicher Lymphozytenpopulationen bestimmt werden.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zytokinproduktion wurden die Zellen zunächst für 5 Stunden mit 20 ng/ml PMA, 1 µM Ionomycin und 3 µM Monensin (GolgiStop BD, Heidelberg) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, gezählt und jeweils 1×10^6 Zellen pro FACS-Ansatz mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Nach einer direkten Antikörperfärbung der Oberflächenmoleküle wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C in 250 µl Fixierungs-/Permeabilisierungs-Lösung (BD, Heidelberg) fixiert. Die permeabilisierten Zellen wurden 2x mit BD Perm/Wash (BD, Heidelberg) gewaschen und anschließend mit dem Antikörper für die Intrazellulärfärbung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit BD Perm/Wash wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und im durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.6 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die gleichzeitige Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen. Das Durchflusszytometer erlaubt die simultane Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen an einzelnen Zellen [239]. Zellen werden hierfür mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt und die Zellsuspension aus dem Proberöhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Trifft Licht auf die Zellen, wird der Strahl in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Zellen gestreut. Als Lichtquellen standen im verwendeten Gerät zwei Laser (blauer Argon-Laser und roter Dioden-Laser) für die Anregung der Farbstoffe zur Verfügung. Das Durchflusszytometer unterscheidet zwischen:

- a) Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSc) entlang der Achse des einfallenden Lichtes, welches ein Maß für die Größe der Zellen darstellt.
- b) Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSc), das im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird und Aussagen über die intrazelluläre Granularität erlaubt.
- c) Fluoreszenzintensität, bei denen das Fluorochrom der markierten Zellen durch den Laser angeregt wird, und die Energie in Form von Licht einer anderen, höheren Wellenlänge emittiert wird. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist abhängig vom eingesetzten Fluorochrom. Als Fluorochromkonjugate wurden FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein) und APC (Allophycocyanin) verwendet. Außerdem wurden die Zellen kurz vor der Messung mit Propidium-Iodid (PI), einem DNA-Farbstoff versetzt, um tote Zellen ausschließen zu können. Die Emission der Farbstoffe wurde in vier Kanälen gemessen:

Fluoreszenzkanal 1 (FI1)	FITC- und CFSE-Fluoreszenzintensität
Fluoreszenzkanal 2 (FI2)	PE-Fluoreszenzintensität
Fluoreszenzkanal 3 (FI3)	PI- und PerCP-Fluoreszenzintensität
Fluoreszenzkanal 4 (FI4)	APC-Fluoreszenzintensität

Die Versuche wurden am Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programms FlowJo® (Tree Star, Ashland, USA).

3.2.1.7 Fluoreszente Zellsortierung

Die fluoreszente Zellsortierung ist eine Spezialanwendung der Durchflusszytometrie und wurde mit Hilfe des FACSaria (BD, Heidelberg) durchgeführt. Hierbei wurde das Gerät samt Schläuchen vor jedem Sortiervorgang für 15 min mit 70 % Ethanol sterilisiert und mit PBS gespült. Anschließend wurde der Zellsortierer mit Accudrop-Beads (BD, Heidelberg) kalibriert. Dabei wurde die Einstellung der Spiegel im Gerät, das Auftreffen des Laserpunktes und die Form des Laserpunktes adjustiert. Die zu sortierenden Zellen wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern (3.2.1.5) und zum Ausschluss toter Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und vor Sortierung über ein 30 µm Zellfilter (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach) filtriert, um möglichst vereinzelte Zellen zu erhalten. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen, nach Einstellung eines *sort-gate* anhand der Expression der gewünschten Oberflächenmarker selektiert und in ein Ausgabegefäß sortiert. Die Frequenz gemessener Zellen lag bei durchschnittlich 15000 Zellen/s. Nach Sortierung wurde die Reinheit der sortierten Zellen durch eine durchflusszytometrische Reanalyse am FACS Calibur bestimmt. Soweit nicht anders angegeben, betrug die erhaltene Reinheit von FACS-sortierten Zellpopulationen über 98 %.

3.2.1.8 Magnetische Zellseparation (MACS)

Diese Zell-Anreicherungsverfahren beruht auf der Bindung von Eisenpartikeln-beschichteten Antikörper (*beads*) an die Zelle, und deren anschließende Anreicherung in einem Magnetfeld. Hierbei stehen positive und negative Anreicherungsverfahren zur Verfügung. Im ersten Fall werden die *beads* an die zu isolierende Subpopulation gebunden, bei der Negativselektion werden die zu depletierenden Zellpopulationen mit *beads* markiert, so dass das Eluat die Zielpopulation enthält.

In dieser Arbeit wurden *beads* der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) verwendet und die Separation gemäß des vom Hersteller vorgeschlagenen Protokolls durchgeführt. Dazu wurde die Zellen zunächst in FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (1200 rpm/10 min/4 °C), und das Pellet in FACS-Puffer resuspendiert und mit den gewünschten *beads* für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit MACS-Puffer aufgefüllt, über ein 70 µm Zellsieb filtriert und abzentrifugiert (1200 rpm/10 min/4 °C). Für die Aufreinigung der Zellen wurden LS-, MS- und LD-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) verwendet, die in einen Permanentmagneten (Midi-MACS/Quadro-MACS, Miltenyi Biotec) eingespannt werden. Vor dem Säulenlauf wurde die Säule mit MACS-Puffer equilibriert. Das Zellpellet wurde in MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule gegeben. Die nicht magnetisch markierten Zellen wurden eluiert, während die positiven Zellen zurückgehalten wurden. Nach dreimaligem Nachspülen der Säule mit MACS-Puffer wurde sie aus dem Magneten entnommen und über einem passenden Sammelröhrchen mit einem Puffervolumen von 5ml durchgespült. Nach den entsprechenden Aufreinigungsschritten erfolgte eine durchflusszytometrische Kontrolle der Reinheit. Die Reinheit der über MACS getrennten Zellpopulationen betrug üblicherweise > 90 %.

3.2.1.9 Isolierung von Treg- und T-Zell-Subpopulationen

Humane PBMCs wurden aus Leukapheresaten über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und zunächst mit PE-anti-Human-CD25 Antikörpern für 20 min bei 4 °C gefärbt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit anti-PE-*beads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gemäß dem Herstellerprotokoll über LS-Säulen im Midi-MACS-System nach Positiv- und Negativ-Fraktion separiert. Beide Zellfraktionen wurden im Anschluss mit FITC-anti-Human-CD4 Antikörpern 20 min bei 4 °C gefärbt und nach einem weiteren Waschschrift über ein 30 µm Zellsieb filtriert. Zum Ausschluss toter Zellen wurde die Zellsuspension mit 10 % Propidiumiodid versetzt und anschließend im Durchflusszytometer FACS Aria in CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg} T-Zellsubpopulationen sortiert. Zur Sortierung naiver (CD45RA⁺) und antigenerfahrener (CD45RA⁻) Treg-Subpopulationen wurde die MACS-angereicherte CD25⁺-Fraktion zusätzlich mit APC-anti-Human-CD45RA gefärbt und im Durchflusszytometer

FACS Aria sortiert (3.2.1.7). Die sortierten T-Zellpopulationen wurden im Anschluss auf ihre Reinheit durchflusszytometrisch analysiert und hatten in der Regel eine Reinheit > 98 %.

3.2.1.10 Kultivierung von Treg- und T-Zell-Subpopulationen

3.2.1.10.1 Expansion von Treg- und T-Zell-Subpopulationen

Die sortierten CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen wurden mit Hilfe zweier verschiedener Systeme polyklonal expandiert. In einem System (L-Zellkultur) dienten spezielle murine Fibroblasten, so genannte CD32⁺ L-Zellen, als Stimulatoren, welche den humanen Fcγ-Rezeptor II (CD32) exprimieren und dadurch exogen zugeführte anti-human-CD3- und anti-human-CD28-Antikörper binden und präsentieren (**Abb. 3-1**). Das zweite System bestand aus artifiziellen APCs in Form von magnetischen Polystyrolkugeln (*beads*), so genannten CD3/CD28 T-Zell-Expansions-*beads* (*T Cell Expander*, TCE), die anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper in einer optimierten Mischung auf ihrer Oberfläche tragen. Um den anergen Zustand der humanen natürlichen Treg-Zellen überwinden zu können, wurde dem Kulturmedium zusätzlich 300 U/ml humanes IL-2 zugesetzt.

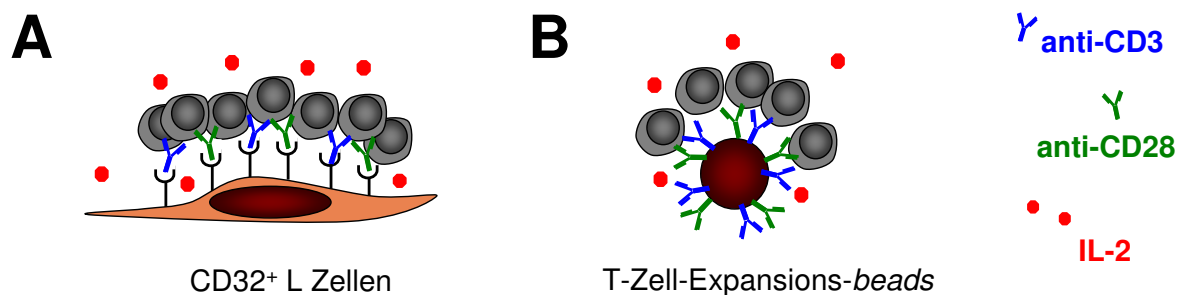


Abb. 3-1: Polyklonale Expansionssysteme.

Die Expansion humaner Treg- und T-Zell-Subpopulationen erfolgte polyklonal durch Stimulierung über anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper in Gegenwart von 300 U/ml IL-2. (**A**) CD32⁺ L-Zellen sind eine Mausfibroblasten-Zelllinie, die nach Transfektion den humanen humanen Fcγ-Rezeptor II (CD32) auf der Oberfläche exprimieren. Über diesen können sie exogen zugegebene anti-human-CD3- und anti-human-CD28-Antikörper binden und dadurch T-Zellen polyklonal aktivieren. (**B**) *T Cell Expander* (TCE)-Dynabeads® (Invitrogen/Dynal, Oslo) tragen anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper in einer optimierten Mischung auf ihrer Oberfläche.

3.2.1.10.2 L-Zellkultur

1 bis 2 Tage vor dem Beginn einer Kultur wurden $1,5 \times 10^4$ CD32⁺ L-Zellen in 96-well-Flachbodenplatten in 100 µl cRPMI ausgesät. Nach Zellsortierung (3.2.1.7) wurden jeweils $1 - 2 \times 10^4$ Zellen der Treg- bzw. T-Zell-Subpopulationen pro well angesetzt. Dazu wurde zunächst das Medium aus der 96-well-Flachbodenplatte mit CD32⁺ L-Zellen abgenommen und die gewünschte Zellsubpopulation mit 300 U/ml IL-2, 100 ng/ml anti-CD3-Antikörpern (OKT3) sowie 100 ng/ml anti-CD28-Antikörpern in einem Endvolumen von 200 µl/well mit cRPMI-Medium eingesät. Vier bis 5 Tage nach Kultur wurde 80 µl Medium abgenommen und 80 µl cRPMI/ 300

U/ml IL-2 dazugegeben. Ein bis 2 Tage vor Umsetzung wurden $3,8 \times 10^5$ CD32⁺ L-Zellen in 6-well-Zellkulturplatten in 2,5 ml cRPMI ausgesät. 30 min bis 1 h vor dem Umsetzen wurde das Medium der CD32⁺ L-Zellen abgenommen und jeweils 2,5 ml cRPMI-Medium (300 U/ml IL-2, 100 ng/ml anti-CD3 bzw. anti-CD28) zugefügt. T-Zell-Subpopulationen wurden aus den 96-well-Flachbodenplatten geerntet, die Zellzahl bestimmt und 1×10^6 Zellen der jeweiligen Treg- bzw. T-Zell-Subpopulationen in 500 µl cRPMI/300 U/ml IL-2 pro 6-well ausgesät. Der Medienverbrauch der Zellen wurde regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls wurden 1 bis 2 ml cRPMI/300 U/ml IL-2 zugegeben. Umgesetzt wurden die Zellen jeweils an Tag 6, 11, 17 und 22. Zu diesen Zeitpunkten wurde der Phänotyp der Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.10.3 TCE-Kultur

Nach Zellsortierung (3.2.1.7) wurden jeweils 1×10^4 Zellen der jeweiligen Treg- bzw. T-Zell-Subpopulationen pro well in einer 96-well-Rundbodenplatten pro well mit 4 TCE-beads/Zelle in 100 µl cRPMI/300 U/ml IL-2 angesetzt. Nach 4 Tagen Kultur wurden 100 µl cRPMI/300 U/ml IL-2 dazugegeben. An Tag 7, 14 und 21 wurden die Zellen umgesetzt. Dazu wurden die jeweiligen T-Zell-Subpopulationen sorgfältig resuspendiert, in ein 14 ml Polystyrolröhrchen überführt und anschließend für 2 min in einen Magnetseparator gestellt. Magnetische beads lagern sich dabei an den Magneten an und durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes erhält man eine bead-freie Zellsuspension. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden an Tag 7 jeweils $2,5 \times 10^5$ CD4⁺CD25⁻ Zellen/well und 5×10^5 CD4⁺CD25^{high/int} Zellen/well mit 1 TCE-bead/Zelle in 1 ml cRPMI/300 U/ml IL-2 in 24-well-Flachbodenplatten ausgesät. An Tag 14 wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ CD4⁺CD25⁻ Zellen/well mit 0,1 TCE-bead/Zelle und 5×10^5 CD4⁺CD25^{high/int} Zellen/well mit 1 TCE-bead/Zelle in 1 ml cRPMI/ 300 U/ml IL-2 in 24-well-Flachbodenplatten ausgesät. Der Medienverbrauch der Zellen wurde regelmäßig kontrolliert und bei Bedarf wurden 500 µl cRPMI/300 U/ml IL-2 ausgetauscht. Zu den Zeitpunkten des Umsetzens wurde der Phänotyp der Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.10.4 Ruhigstellen *in vitro* expandierter Zellen

Zur Überprüfung der suppressiven Aktivität *in vitro* expandierter Treg-Subpopulationen wurden diese an Tag 11 (L-Zellkultur) bzw. an Tag 14 (TCE-Kultur) geerntet und für weitere 4 Tage ohne Stimulation über CD3/CD28 in cRPMI/300 U/ml IL-2 ruhiggestellt. In Abhängigkeit von der Zellzahl wurden 1×10^6 Zellen/well in 24-well-Zellkulturplatten in 1 ml cRPMI/300 U/ml IL-2 oder 5×10^6 Zellen/well in 6-well-Zellkulturplatten in 5 ml cRPMI/300 U/ml IL-2 ruhiggestellt.

3.2.1.10.5 Kurzzeitstimulation von Treg- und T-Zell-Subpopulationen

Für Kurzzeitstimulationen über 4, 18, 48, 72 und 96 h wurden nach Zellsortierung (3.2.1.7) der Treg- bzw. T-Zell-Subpopulationen jeweils 5×10^5 Zellen mit 1 TCE-bead/Zelle pro well in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen gut

resuspendiert, in ein 4 ml Polystyrolröhrchen überführt und anschließend für 2 min in einen Magnetseparator gestellt. Magnetische *beads* lagern sich dabei an den Magneten an und durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes erhält man eine *bead*-freie Zellsuspension. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden Zelllysate zur Isolierung der Gesamt-RNA (3.2.2.2) hergestellt.

3.2.1.11 Cytometric bead array (CBA)

Mit Hilfe des *cytometric bead arrays* (CBA) können in biologischen Proben mehrere Zytokine gleichzeitig durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Tests war es möglich, die humanen Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, TNF und IFN- γ nachzuweisen (human Th1/Th2 CBA, BD, Heidelberg).

Das Testsystem besteht aus zwei Komponenten, einer Partikelsuspension, die als *capture*-Reagenz eingesetzt wird und einer Antikörperlösung, die als Indikator-Reagenz eingesetzt wird. Die Partikelsuspension setzt sich aus fünf unterschiedlich stark fluoreszierenden Populationen von *beads* zusammen, die durch die im Detektor FL3 gemessene Fluoreszenz differenzierbar sind. Jede *bead*-Population besitzt einen anderen Zytokin-spezifischen *capture*-Antikörper auf ihrer Oberfläche. Das Indikator-Reagenz besteht aus fünf unterschiedlichen Zytokin-spezifischen PE-konjugierten Antikörpern, die an *beads* gebundene Zytokine markieren. Die mit dem Detektor FL2 gemessene mittlere Fluoreszenz-Intensität jeder *bead*-Population ist dann proportional zur Menge der gebundenen Indikator-Antikörper und damit zur Dichte der Zytokine auf der Oberfläche der *beads*.

Durchführung (nach Anleitung im CBA-Kit, alle benötigten Reagenzien sind im Test-Kit enthalten): Pro Reaktionsgefäß wurden jeweils 10 μ l der fünf verschiedenen *bead*-Suspension miteinander gemischt. Für die Standardkurve wurden jeweils 50 μ l der Verdünnungsstufen des Zytokin-Standards (0 pg/ml, 20 pg/ml, 40 pg/ml, 80 pg/ml, 156 pg/ml, 312 pg/ml, 625 pg/ml, 1250 pg/ml, 5000 pg/ml; die Konzentration bezieht sich auf jedes der fünf verschiedenen Zytokine) pro 50 μ l *bead*-Suspension hinzugefügt. Anschließend wurden 50 μ l der Serumprobe mit 50 μ l *bead*-Suspension gemischt und in jedes Reaktionsgefäß 50 μ l Detektions-Reagenz pipettiert und 2h im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden dann in 1 ml Waschpuffer verdünnt und 5 min bei 200 x *g* zentrifugiert, anschließend in 300 μ l Waschpuffer aufgenommen und am LSR-II-Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der FCAP Array Software (BD, San Jose).

3.2.1.12 CFSE-Färbung

Für Proliferationsuntersuchungen wurden konventionelle T-Zellen mit CFSE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) markiert. CFSE ist ein weitgehend ungeladener Fluoreszenzfarbstoff, der durch Zellmembranen hindurch in das Zytosol von Zellen

diffundieren kann. Durch endogene Esterasen werden lipophile Gruppen abgespalten, wodurch eine geladene Form des Farbstoffes entsteht, der die Zelle nicht mehr verlassen kann. Durch die aktivierte Gruppe wird der Farbstoff kovalent an freie Aminogruppen zellulärer Proteine gebunden, so dass die Mutterzellen fluoreszent markiert werden. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, so dass die Intensität der Markierung bei jeder Teilung kontinuierlich abnimmt [240].

Für die Färbung wurden jeweils 10×10^6 Zellen in ein 14 ml Polystyrolröhrchen überführt und 2x in PBS gewaschen. Anschließend wurde 500 µl PBS und 500 µl CFSE-Färbelösung (6 µM CFSE in PBS für frisch isolierte CD4⁺ Zellen bzw. 4 µM CFSE in PBS für kultivierte RA⁺ Treg-Zellen) auf das Zellpellet pipettiert und 4 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken im Dunklen inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden abschließend zum Abstoppen der Reaktion mit 1x mit PBS (10 % FCS) und 1x mit cRPMI gewaschen und ausgezählt. Die markierten Zellen wurden dann für *in vitro* Proliferationsanalysen, bzw. für adoptive Transferexperimente eingesetzt.

3.2.1.13 Suppressions-Assay

Die suppressive Aktivität *in vitro* expandierter Treg-Subpopulationen bzw. T-Zell-Subpopulationen wurde anhand des Suppressions-Assays getestet. Das Prinzip des Tests beruht auf der polyklonalen Aktivierung CFSE-markierter konventioneller T-Zellen (Tkonv), deren Proliferation anhand der Abnahme der CFSE-Intensität durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der Hemmung der Proliferation aktivierter Tkonv-Zellen werden CFSE-markierte Tkonv-Zellen mit *in vitro* expandierten Treg-Subpopulationen oder anderen T-Zell-Subpopulationen kokultiviert und nach 4 bis 5 Tagen die CFSE-Intensität durchflusszytometrisch bestimmt.

Dazu wurden aus aufgetauten PBMCs CD4⁺ T-Zellen zunächst über MACS separiert (vgl. 3.2.1.8) und mit CFSE (vgl. 3.2.1.12) gefärbt. *In vitro* können T-Zellen durch Quervernetzung der TCR-assoziierten CD3-Komplexe mittels Antikörper stimuliert werden. Die polyklonale Aktivierung erfolgte in Gegenwart von CD2-depletierten autologen PBMCs mit anti-CD3-Antikörpern (OKT3). Aus der CD4⁺-Fraktion der PBMCs wurden CD2⁺ Zellen (T-Zellen und NK-Zellen) mit Hilfe von anti-Human-CD2PanT-Dynabeads® depletiert. Dazu wurden jeweils 10×10^6 CD4⁺ Zellen mit 45 µl CD2-Dynabeads 20 min bei 4 °C in einem Rotor (Sample mixer, Invitrogen/Dynal, Oslo) inkubiert und anschließend für 4 min in einen Magnetseparator gestellt. Magnetisch markierte Zellen lagern sich dabei an den Magneten an und durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes erhält man die gewünschte CD2-depletierte Zellfraktion. Um eine Proliferation der CD2-depletierten PBMCs auszuschließen wurden sie mit 30 Gy in einem Bestrahlungsgerät (IBL437C) am Institut für klinische Chemie der Universität Regensburg bestrahlt. Für die Proliferationsanalyse wurden in einer 96-well-

Rundbodenplatte 5×10^4 CFSE-markierte $CD4^+$ Tkonv-Zellen zusammen mit 5×10^4 $CD2^-$ depletierten, bestrahlten, autologen PBMCs in Gegenwart von 100 ng/ml OKT-3 in 200 μ l cRPMI stimuliert. Zur Bestimmung der suppressiven Aktivität wurden $1,25 \times 10^4$ autologe *in vitro* expandierte Treg- bzw. andere T-Zell-Subpopulationen (Tkonv:Treg 4:1) kokultiviert. Als Kontrolle dienten Ansätze, in denen 5×10^4 CFSE-markierte Tkonv-Zellen in Gegenwart von $1,25 \times 10^4$ unmarkierten Tkonv-Zellen stimuliert wurden. Nach Kultivierung über 4–5 Tage wurden jeweils 3 bis 4 wells/Ansatz geerntet, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt und im FACSCalibur durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.14 $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Proliferationstest

$^3\text{[H]}$ -Thymidin wird von Zellen ausschließlich als Baustein für die DNA-Synthese verwendet. Damit lässt der Einbau des Nukleotids in das Genom Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität zu. Die inkorporierte Radioaktivität wurde durch eine indirekte Gasentladungsmethode gemessen. Das über die mit Tritium markierte Probe hinwegströmende Edelgas Helium wird in einem elektrischen Feld durch die beta-Strahlen ionisiert. Die daraus resultierende Entladung wird als eine vom Messgerät abhängige Zählrate in *counts per minute* (cpm) registriert.

Für die MLR wurden murine Zellen bzw. Zellpopulationen entsprechend der unterschiedlichen Protokolle (3.2.3.8.2) direkt nach der Aufarbeitung als Triplikate auf 96-well-Rundbodenplatten in cRPMI Medium ausgesät. 1×10^5 Tkonv-Zellen ($CD4^+CD25^-$ T-Zellen) wurden mit jeweils 1×10^5 allophenen Stimulatorzellen ($CD90^-$ depletierte Milzzellen) in 200 μ l cRPMI stimuliert. Zur Bestimmung der suppressiven Aktivität wurden unterschiedliche Zahlen muriner $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen hinzu titriert, so dass die Verhältnisse Tkonv:Treg 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 und 16:1 resultierten. Die Stimulation von 1×10^5 Tkonv-Zellen in Gegenwart von 1×10^5 Tkonv-Zellen diente als Negativkontrolle, da hier keine suppressive Aktivität zu erwarten war. Nach 4 Tagen wurde die $^3\text{[H]}$ -Thymidinlösung zugegeben (jedes well 20 μ l/well = 0,5 μ Ci). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Platten bei -20 °C eingefroren. Letzteres diente dem Abstoppen der Reaktion und dem Zellaufschluss, der die Freisetzung der DNA bewirkte. Nach dem Auftauen wurden die Lysate mit Hilfe eines Harvesters (Vacusafe IH-280, Innotech) auf eine Filterplatte (Unifilter, Packard, Niederlande) überführt. Die DNA bleibt auf dem Filter zurück, während ungebundenes $^3\text{[H]}$ -Thymidin herausgewaschen wurde. Der Boden der Filterplatte wurde nach dem Abtrocknen mit Klebefolie abgedichtet, mit 50 μ l/well Szintillationsflüssigkeit (Microscint-20, PerkinElmer, Rodgau) betropft und im Szintillationszähler (1450 MicroBeta liquid scintillation counter, Wallac Oy/PerkinElmer) gemessen.

Als Maß für die Proliferation wurden *counts per minute* (cpm) angegeben, welche die Menge des eingebauten Thymidins repräsentieren.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Western-Blot-Analyse

3.2.2.1.1 Herstellung von Gesamt-Zelllysaten für die Western-Blot-Analyse

Zu analysierende Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert (1200 rpm/ 6 min/ 4 °C) und die Zellzahl bestimmt. Die gewünschte Zellzahl (in der Regel 1×10^6 Zellen) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluß pipettiert, mit PBS aufgefüllt und in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (3500 rpm/ 5 min/ 4 °C). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt, das Zellpellet in 100 µl SDS-Lysepuffer (für 1×10^6 Zellen) aufgenommen und die viskose Suspension durch kräftiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurde das Zellysat kurz gevortext, 5 sec abzentrifugiert und bei 95 °C für 10 min im Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis abgekühlt und entweder gleich auf das Gel geladen oder bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

3.2.2.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, erfolgte auf SDS-Polyacrylamid-Gelen, bestehend aus Sammel- und Trenngel (Lämmli, 1970). Zwischen zwei Glasplatten der Gelkammer wurde in den durch einen *spacer* entstehenden Raum zuerst das Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine möglichst glatte Grenzfläche zum Sammelgel zu erreichen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und je nach Probenanzahl und -volumen ein passender Kamm eingefügt. Nachdem auch das Trenngel vollständig auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laemmli-Elektrodenpuffer aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Proben (Lysat von 100.000 Zellen/Tasche) in die Taschen geladen und die elektrophoretische Auftrennung gestartet. Der Vorlauf des Obergels erfolgte bei 70 V für etwa 30 min, der Lauf des Untergels bei 120 bis 145 V. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Laemmli-Puffer den unteren Rand der Gelplatten erreicht hatte. Anschließend wurden die aufgetrennten Protein-Fractionen aus dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.2.3).

Die verwendeten Gele setzten sich im Einzelnen aus folgenden Komponenten zusammen:

Lösung	Sammelgel 5 %	Trenngel 12 %
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30 %)	16,65 ml	40 ml
Sammelgelpuffer	25 ml	-
Trenngelpuffer	-	25 ml
10 % SDS-Lösung	1 ml	1 ml
Aqua bidest	ad 100 ml	ad 100 ml

Vor dem Gießen wurden die Stammlösungen der Sammel- und Trenngele wie folgt vervollständigt:

Lösung	Sammelgel	Trenngel
Stammlösung	2,5 ml	5 ml
TEMED	10 µl	5 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	50 µl	5 µl

3.2.2.1.3 Western-Blot

Zur Detektion der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese auf eine PVDF Membran transferiert [241]. Dazu wurden jeweils drei Whatman-Papierstücke in Gelgröße mit den Transferpuffern A, B und C getränkt (3.1.3). Dann wurde ein Sandwich aus je drei Whatman-Papieren mit Puffer A und B auf die Anodenplatte der Blot-Apparatur gelegt. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol befeuchtet, in Puffer B gespült und als nächste Schicht auf die Whatman-Papiere gelegt. Anschließend wurde das Gel, welches zuvor 15 min in Transferpuffer B inkubiert wurde, aufgelegt und mit drei Lagen Whatman-Papier Puffer C bedeckt. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 1 h bei einer Stromdichte von 0,8 mA/cm² Gelfläche.

3.2.2.1.4 Detektion membrangebundener Proteine durch Antikörper

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran 1h in Blockierlösung (3.1.3) bei RT blockiert. Anschließend wurde sie abgetropft, auf einen in einer Petrischale befestigten Parafilm überführt, mit 5 ml Primärantikörper-Lösung (FOXP3 1:250 bzw. β-Aktin 1:1000) überschichtet und üN im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x für 6 min in 1 x TBS-Tween auf einem Schüttler gewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (mit *horseradish peroxidase*, HRP gekoppelt) erfolgt für 1h bei RT. Danach wurde die Membran 3 x für 6 min auf einem Schüttler in 1 x TBS-Tween (0,1 %) gewaschen.

Einzig vor der Detektion wurde die Membran in Tensid-freiem TBS gewaschen. Der eigentliche Nachweis beruht auf einer Chemolumineszenz-Reaktion (ECL), die durch die HRP-katalysierte Oxidation eines Substrats (Luminol) hervorgerufen wird. Diese Lichtemission kann anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) sichtbar gemacht werden. Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Western-Blot-System (MobiGlow). Die Dauer der Filmexposition variierte zwischen 15 Sekunden und 10 min.

3.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Bei der Arbeit mit RNA wurde eine Reihe von Maßnahmen getroffen, um das gegenüber endogenen und exogenen RNAsen sehr empfindliche Molekül zu schützen und Kontaminationen zu vermeiden. Dazu gehörte die Benutzung von Filterspitzen und RNase-freier Plastikware, das Arbeiten mit Latexhandschuhen, Lagerung der Proben auf Eis (soweit nicht anders vorgegeben) sowie die Behandlung aller eingesetzten Lösungen mit 0,1 %-igem Diethylpyrocarbonat (DEPC), wodurch eventuell vorhandene RNAsen vernichtet werden [242]. Zellen bzw. Zellysate, die zur Extraktion von RNA bestimmt waren, wurden zur Asservierung für kurze Zeit (< 1 Monat) bei -20°C und für längere Zeit (> 1 Monat) bei -80°C gelagert. Die Isolierung erfolgte in Abhängigkeit von der Zellzahl mit Hilfe des RNeasyMini Kits (Zellzahlen $> 1 \times 10^6$) bzw. RNeasyMicro Kits (Zellzahlen $\leq 0,5 \times 10^6$) oder mit TRIzol (Zellzahlen $> 10 \times 10^6$) und wurde nach dem im Handbuch des Herstellers vorgeschlagenem Protokoll durchgeführt. Zur Eliminierung von DNA-Spuren wurde bei der RNA-Isolation nach TRIzol im Anschluss und bei der RNA-Isolation nach Qiagen währenddessen ein DNaseI – Verdau (100 U/ml DNaseI , 10 min bei 37°C) durchgeführt. Um die Konzentration der extrahierten RNA zu bestimmen, wurden die Proben photometrisch vermessen. Die Reinheit und Integrität der RNA wurde mit Hilfe des Agilent 2100 bioanalyzer unter Verwendung des RNA 6000 Nano LabChip® Kits (Agilent Technologies) gemäß den Vorgaben des Herstellers überprüft. In der anschließenden reversen Transkription wurden nur RNA-Proben mit entsprechender Qualität eingesetzt.

3.2.2.3 Reverse Transkription

Durch die reverse Transkriptase wird die als Matrize dienende RNA, ausgehend von angelagerten Primern, zu einer komplementären, einzelsträngigen DNA (cDNA) umgeschrieben. Für *real-time* PCR (siehe 3.2.2.4) Analysen wurde die cDNA mit Hilfe von Random-Hexamer-Primern synthetisiert. Diese Primer bieten den Vorteil, dass sie an verschiedenen Stellen, die über das gesamte RNA Molekül verteilt sind, binden. Hierdurch wird auch nicht polyadenylierte RNA unter anderem 18S-RNA revers transkribiert, die später

zur Normalisierung genutzt werden kann. Zur Herstellung der cDNA wurde ein 20 µl Reaktionsansatz hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzte:

4 µl 5x First Strand Synthesis Buffer
 2 µl 0,1M DTT
 3 µl RNase-freies Wasser
 1 µl reverse Transkriptase
 1 µl 10µM dNTP
 1 µl random primer (Promega, Mannheim)
 1µl RNasin (Promega, Mannheim)
 x µl RNA (250 ng bis zu 5µg)
 ad H₂O (RNase-frei) x µl

Innerhalb einer Versuchsreihe wurde von jeder zu analysierenden Probe dieselbe Menge RNA in die Reverse Transkription eingesetzt. Die als Matrize dienende RNA wurde in entsprechender Konzentration in gekühlten Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit Wasser, dNTPs und den entsprechenden Primern gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 70 °C denaturiert, wodurch die RNA anschließend linear und einzelsträngig vorlag. Die Proben wurden dann zur Abkühlung auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und mit 10 µl des Gemisches aus Dithiothreitol (DTT), Puffer, Wasser, RNasin und reverser Transkriptase (SuperScript II, Invitrogen, San Diego, CA) versetzt. Zur Verlängerung der Random-Primer wurde der Ansatz zunächst für 10 min bei RT inkubiert. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 60 min. Ein anschließender Denaturierungsschritt bei 70°C für 15 min führte zur Inaktivierung der reversen Transkriptase. Die cDNA wurde direkt zur Amplifizierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert.

3.2.2.4 *real-time* Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist die selektive Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen möglich [243]. Durch den Einsatz von thermostabilen DNA-Polymerasen [244] ist eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblöcken möglich. Im ersten Schritt wird die DNA-Matrize durch Hitzedenaturierung aufgeschmolzen. Hierdurch wird in einem zweiten Schritt die Bindung der Primer an ihre entsprechende Zielsequenz ermöglicht (Annealing). Von dem kurzen doppelsträngigen Bereich ausgehend wird im letzten Schritt der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'-3'-Richtung synthetisiert (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Reaktionsfolge wird eine exponentielle, selektive Anreicherung des gewünschten Transkripts erreicht. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierter Moleküle.

Die hohe Sensitivität der PCR erfordert die strikte Vermeidung von Kontaminationen durch DNA. Daher wurden verschiedene Maßnahmen zur Kontaminationsprophylaxe ergriffen, wie z.B. regelmäßige UV-Bestrahlung der PCR-Arbeitsplätze, Vermeidung der Benutzung jeglicher DNA am PCR-Arbeitsplatz und Verwendung von Pipettenspitzen mit Filtereinsatz zum Schutz vor Aerosol-Kontaminationen [245].

Die *real-time* PCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR-Produkte über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green genutzt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Nach jedem PCR-Zyklus wird mittels lasergesteuerter Analyse die Menge an doppelsträngiger DNA mit interkaliertem SYBR-Green gemessen. Die Zyklenanzahl bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt ergibt den Ct-Wert (*cycle threshold*, Ct). Vor der Durchführung einer *real-time* PCR wurden die Primer und die Amplifikationsbedingungen anhand einer konventionellen RT-PCR etabliert.

Für die Quantifizierung der FOXP3 mRNA wurden *in vitro* expandierte Zellen zu einem definierten Zeitpunkt geerntet oder frisch sortierte Zellpopulationen verwendet. Die gesamte zelluläre RNA wurde extrahiert (3.2.2.2), mit Hexamer-Primern revers transkribiert (3.2.2.3) und die erhaltene cDNA in der *real-time* PCR eingesetzt. Alle Reaktionen wurden mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) und dem LightCycler II (Roche, Mannheim) Gerät durchgeführt. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Volumen von 20 µl ausgeführt:

10 µl SYBR Green Mix (2x)
1 µl Forward Primer (10 µM)
1 µl Reverse Primer (10 µM)
6 µl H₂O
2 µl cDNA (1:6 verd. mit H₂O)

Für alle Primerpaare wurden bei jedem PCR-Lauf eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe einer geeigneten Probe (1, 1:10, 1:100, 1:1000) generiert, um die Effizienz der Amplifikation (*slope*) zu erhalten. Aus dem erhaltenen *slope*-Wert konnte in Kombination mit den ermittelten Ct-Werten die jeweilige DNA-Menge kalkuliert werden. Soweit nicht anders angegeben diente die Quantifizierung der 18S rRNA zur Normalisierung der einzelnen Proben. Lediglich zur Ermittlung des geeigneten Haushaltsgens für die Quantifizierung der FOXP3 mRNA *in vitro* expandierter Zellen wurde absolut quantifiziert.

Das *real-time* PCR-Protokoll bestand, nach 15-minütiger Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C, aus 45 Zyklen mit jeweils 15 s Denaturierungsphase bei 95 °C, 20 s Annealingphase bei 57 °C und 20 s Elongationsphase bei 72 °C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Nach dem Ende des Amplifikationsprogramms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert.

Dazu wurde die DNA langsam (0,1 °C/sec) von 60 °C auf 90 °C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Anhand der Schmelzkurven-Analyse kann die Spezifität einer PCR-Reaktion überprüft werden.

3.2.3 Tiermodell

3.2.3.1 Mauszucht und Haltung

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden in Tierställen der Universität Regensburg nach den geltenden tierschutzrechtlichen und standardisierten Bestimmungen in Barrieren gezüchtet und gehalten. Die Tiere wurden in Mikroisolatorkäfigen mit sterilem Einstreu, Futter und autoklaviertem Trinkwasser *ad libidum* gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h. Zur Zucht wurden phänotypisierte RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse im Alter von 6-12 Wochen im Verhältnis 1:1 oder 1:2 verpaart. BALB/c- und C57BL/6-Mäuse wurden kommerziell bei Charles River bezogen und in der konventionellen Tierhaltung des Universitätsklinikum Regensburg untergebracht. BALB/c-Empfängermäuse der Transplantationsexperimente wurden bis vier Wochen *post transplantationem* in IVCs (*isolated ventilated cages*) mit Cotrim-versetztem Trinkwasser (500 mg Sulfomethoxazol und 100 mg Trimethoprim/1000 ml Trinkwasser) *ad libidum* gehalten. Transplantierte RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen in IVCs mit sterilem Einstreu gehalten und es wurde steriles Futter und Cotrim-versetztes Trinkwasser (500 mg Sulfomethoxazol und 100 mg Trimethoprim/ 1000 ml Trinkwasser) *ad libidum* verabreicht.

3.2.3.2 Blutabnahme

Zur Blutabnahme wurde die Schwanzspitze der Maus mit einer Infrarotlampe erwärmt. Nachdem sich die Venen geweitet hatten, wurde eine Lateralvene mit einem Skalpell leicht angeschnitten, das Blut mit einer heparinisierten Kanüle abgenommen, in ein PBS/Heparin gefülltes Röhrchen überführt und kurz geschwenkt. Bei terminalen Untersuchungen wurde das Blut durch Herzpunktion mit einer heparinisierten Spritze entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut direkt in 1,5 ml Reaktionsgefäße ohne Heparin überführt und üN bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Blut für 5 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Serum wurde bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung des Gehalts humaner Zytokine im Serum nach xenogener Transplantation wurde den Tieren wöchentlich Blut abgenommen. Um die Tiere nicht zu stark zu belasten wurde das Blut von Tieren einer Behandlungsgruppe vereinigt, um so ausreichende Mengen Serum für die Analyse zu erhalten.

3.2.3.3 Aufarbeitung von Blutproben zur durchflusszytometrischen Analyse

Für Chimerismus- und terminale Analysen erkrankter Tiere wurde das periphere Blut (PB) durchflusszytometrisch analysiert. Mit PBS aufgefüllte Blutproben wurden dazu zunächst abzentrifugiert (1200 rpm/4 °C/10 min). Das blutige Zellpellet wurde in 1ml Erythrozyten-Lysepuffer (3.1.3) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen wurde das Lysat mit PBS aufgefüllt und erneut abzentrifugiert (1200 rpm/4 °C/10 min). Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit FACS-Puffer 1-2 x gewaschen, bis ein möglichst weißes Pellet zurückblieb. Daraufhin wurden die PBMCs mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt (3.2.1.5) und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.3.4 Töten von Mäusen

Tiere, die zur Organentnahme oder Analyse vorgesehen waren, wurden entweder in einer Kohlendioxid (CO₂)-Atmosphäre oder durch zervikale Dislokation getötet.

3.2.3.5 Sektion von Mäusen

Erkrankte Mäuse, die für eine Sektion bestimmt waren, wurden grundsätzlich in Kohlendioxid getötet, um eine Beschädigung innerer Strukturen, wie sie bei der zervikalen Dislokation vorkommen kann, zu verhindern. Die getöteten Tiere wurden in 70 % Ethanol getränkt und nach Fixierung durch Nadeln auf einer Präparationsunterlage eröffnet. Dabei wurde das Fell in der Bauchunterseite eingeschnitten und mit einem medianen Schnitt nach vorn bis zum Unterkieferwinkel und nach hinten bis zum Becken geöffnet. Zur terminalen Untersuchung erkrankter Tiere wurden Lunge, Leber, Milz, Dick- und Dünndarm sowie Femur und Tibia beider Hinterläufe entnommen.

3.2.3.6 Histopathologie und Gewebefixierung

3.2.3.6.1 Gewebefixierung und Entkalkung von Knochen

Frisch präpariertes Gewebe wurde in 4 % gepuffertem Formalin für mehr als 24 Stunden fixiert. Das fixierte Gewebe wurde am Institut für Pathologie der Universität Regensburg in heißes Paraffin eingegossen und die ausgehärteten Paraffinblöcke bis zur weiteren Verarbeitung bei RT gelagert. Knochenpräparate wurden vor dem Einbetten in Paraffin mit einer EDTA-Entkalkungslösung (3.1.3) bei 37 °C eine Woche lang inkubiert. Im Anschluss wurde die Entkalkung anhand der Elastizität der Knochen getestet und das Präparat bis zur Einbettung wieder in 4 % gepuffertes Formalin überführt. Die Paraffinblöcke mit Gewebeprobe wurden am Mikrotom 3-5 µm dick geschnitten und die Schnitte auf Objektträger aufgebracht. Vor dem Färben der Schnitte wurde das restliche Paraffin bei ca. 80°C abgeschmolzen.

3.2.3.6.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zuerst in Xylol für 10 min, dann in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100 %, 90 %, 70 %, 50 %, 30 %) für jeweils 5 min und schließlich zweimal in aqua bidest. gespült. Danach werden die Schnitte für 5 bis 20 min mit Hämatoxylin gefärbt, wobei die Zeit abhängig von der Färbekraft des Hämatoxylins ist. Die Schnitte werden 5 bis 10 min mit warmem Leitungswasser gebläut und 2 min in Eosinlösung (mit einigen Tropfen Essigsäure) erneut gefärbt. Nach zweimaligem Spülen mit kaltem aqua dest. werden die Schnitte über die aufsteigende Alkoholreihe bis hin zum Xylol wieder entwässert und mit Eindeckmedium eingedeckt.

3.2.3.6.3 Histopathologie

Die histopathologische Beurteilung der Präparate wurde freundlicher Weise von Dr. Ellen Obermann (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Basel) bzw. von Dr. Corinna Vogel (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt. Die Beurteilung der Organe von GvHD-Mäusen bzw. von xenogen erkrankten Mäusen erfolgte anhand eines histologischen GvHD-Scores [246-249].

3.2.3.7 Aufarbeitung von Milz und Knochenmark für durchflusszytometrische Analysen

Final erkrankte Tiere wurden in einer Kohlendioxid (CO₂)-Atmosphäre getötet, in 75 % Ethanol getränkt, Femur und Tibia aus beiden Hinterläufen sowie die Milz entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml Polypropylenröhrchen RPMI (5 % FCS) auf Eis gelagert. Alle weiteren Arbeiten wurden im Labor auf Eis ausgeführt. Die Enden der Knochen wurden mit einer Schere abgeschnitten, die so freigelegten Knochenmarkkanäle mit RPMI (5 % FCS) (10 ml Spritze und 0,6 mm Kanüle) durchgespült und das Knochenmark in einer Petrischale aufgefangen. Das Knochenmark wurde mit einer 5 ml Pipette durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Petrischale wurde zweimal mit 5 ml RPMI (5 % FCS) gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb in das Polypropylenröhrchen pipettiert. Die Milz wurde in eine Petrischale überführt, vom restlichen Bindegewebe befreit und mit Hilfe zweier gebogener Pinzetten ausgestrichen. Nach gründlichem Resuspendieren wurde die Zellsuspension über einen 70 µm Filter in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt, die Petrischale nachgespült und ebenfalls über den Filter gegeben. Die Knochenmarks- und Milz-Zellsuspension wurde mit RPMI (5 % FCS) aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm/ 10 min/ 4° C). Die Pellets wurden jeweils in 4 ml RPMI (5 % FCS) resuspendiert und anschließend die Zellzahl mit Turks-Lösung bestimmt, um absolute Zellzahlen zu ermitteln. Daraufhin wurden jeweils 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer (3.1.3)

zugegeben, die Suspension 1x zügig auf- und abpipettiert und für 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden zunächst 10 ml RPMI (10 % FCS) zugegeben und das Röhrchen anschließend auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1200 rpm/ 10 min/ 4 °C). Nach einem 2. Waschschrift in RPMI (5% FCS) wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl erneut mit Türks-Lösung bestimmt. Jeweils 1×10^6 Zellen des KM bzw. der Milz wurden pro Ansatz mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt (3.2.1.5) und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.3.8 Allogenes Transplantationsmodell

Als Referenzmodell zur xenogenen GvHD wurde ein murines Modell der allogenen Knochenmarkstransplantation gewählt. Die Alloreaktion wurde durch Verwendung komplett MHC-differenter Mausstämme ausgelöst, wodurch Spender-T-Zellen Empfängergerewebe als fremd erkennen. Dazu wurde das Knochenmark (KM) des Mausstammes C57BL/6 in letal bestrahlte BALB/c-Mäuse transplantiert, um eine Rekonstitution der Spenderhämatopoese im Empfängertier zu erreichen. Ein Transfer immunkompetenter konventioneller T-Zellen des C57BL/6-Spenderstammes löste die GvH-Reaktion aus und führte zum klinischen Bild der GvHD.

3.2.3.8.1 Isolierung von murinen Knochenmarkzellen

C57BL/6-Spendertiere wurden in einer Kohlendioxid (CO₂)-Atmosphäre getötet, in 75 % Ethanol getränkt, Femur und Tibia aus beiden Hinterläufen unter möglichst sterilen Bedingungen mit sterilem Präparationsbesteck entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml Polypropylenröhrchen mit sterilem RPMI (5 % FCS) auf Eis gelagert. Alle weiteren Arbeiten wurden im Labor unter der Sterilbank auf Eis ausgeführt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Enden der Knochen mit einer sterilen Schere abgeschnitten und die so freigelegten Knochenmarkkanäle mit RPMI (5 % FCS) (10 ml Spritze und 0,6 mm Kanüle) durchspült. Das herausgedrückte Knochenmark wurde in einer Petrischale aufgefangen und die Zellen mit einer 5 ml Pipette durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Petrischale wurde zweimal mit 5 ml RPMI (5 % FCS) gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb in das Polypropylenröhrchen pipettiert. Die Zellsuspension wurde mit RPMI (5 % FCS) aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm/ 10 min/ 4 °C). Das Pellet wurde in 4 ml RPMI (5 % FCS) resuspendiert, 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer (3.1.3) zugegeben, die Suspension 1x zügig auf- und abpipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden zunächst 10 ml RPMI (10 % FCS) hinzugegeben und das Röhrchen anschließend auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1200 rpm/ 10 min/ 4 °C). Nach einem 2. Waschschrift in RPMI (5% FCS) wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl mit Türks-Lösung bestimmt. Fc-

Rezeptoren wurden mit murinem anti-CD16/CD32-Antikörpern blockiert (1 μ l auf 1×10^7 Knochenmarkzellen) und die Gesamt-Knochenmarkzellen anschließend mit anti-Maus-CD90-*beads* mittels MACS (3.2.1.8) T-Zell-depletiert. Die CD90⁻-Fraktion der Knochenmarkzellen (T-Zell-depletiert, TZD) wurde bis zur Transplantation in RPMI (10 % FCS) auf Eis gelagert. Vor und nach jedem Anreicherungs-schritt wurden Zellen abgenommen, um die Reinheit der einzelnen Fraktionen durchflusszytometrisch analysieren zu können.

3.2.3.8.2 Isolierung von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen bzw. CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen aus murinen Milzzellen

C57BL/6-Spendertiere wurden in einer Kohlendioxid (CO₂)-Atmosphäre getötet, in 75 % Ethanol getränkt, die Milzen unter möglichst sterilen Bedingungen mit sterilem Präparationsbesteck entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml Polypropylenröhrchen mit sterilem RPMI (5 % FCS) auf Eis gelagert. Alle weiteren Arbeiten wurden im Labor unter der Sterilbank auf Eis ausgeführt. Die Milz wurde in eine Petrischale überführt, von Bindegewebe befreit und mit Hilfe zweier gebogener Pinzetten ausgestrichen. Nach gründlichem Resuspendieren wurde die Zellsuspension über einen 70 μ m Filter in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt, die Petrischale nachgespült und die Suspension ebenfalls über den Filter gegeben (maximal 3 Milzen in ein 50ml Röhrchen). Die Zellsuspension wurde mit RPMI (5 % FCS) aufgefüllt, zentrifugiert (1200 rpm/ 10 min/ 4 °C) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 4 ml RPMI (5 % FCS) resuspendiert, 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer (3.1.3) zugegeben, die Suspension 1x zügig auf- und abpipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden zunächst 10 ml RPMI (10 % FCS) zugegeben und das Röhrchen anschließend auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1200 rpm/ 10 min/ 4 °C). Nach einem 2. Waschschrift mit RPMI (5% FCS) wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl mit Türks-Lösung bestimmt. Fc-Rezeptoren wurden mit murinen anti-CD16/CD32-Antikörpern blockiert (1 μ l auf 2×10^8 Milzzellen) und die Milzzellen zunächst mit PE-anti-CD25-Antikörpern (5 μ l auf 2×10^8 Milzzellen) für 20 min bei 4 °C gefärbt. Im Anschluss wurden mittels anti-PE-*beads* (Miltenyi Biotec) gemäß der Vorschrift des Herstellers CD25⁺ Zellen mit der MACS-Technik (3.2.1.8) über LS-Säulen angereichert. Die CD25⁺-Zellfraktion wurde entsprechend der Zellzahl mit FITC-anti-CD4-Antikörpern (2 μ l auf 4×10^6 Milzzellen) für 20 min bei 4 °C gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch im FACS Aria für CD4⁺CD25⁺ Zellen sortiert (3.2.1.7). Für die gemischte Leukozyten-Reaktion wurden ebenfalls CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen aus der CD25⁻-Zellfraktion nach Färbung der Milzzellen mit FITC-anti-CD4-Antikörpern (2 μ l auf 4×10^6 Milzzellen) sortiert. Für Transplantationsexperimente wurden hingegen mit anti-Maus-CD4-*beads* aufgereinigte T-Zellen aus der CD25⁻ Zellfraktion verwendet (3.2.1.8). Die verschiedenen Zellfraktionen wurden bis zur Transplantation in RPMI (10 % FCS) auf Eis

gelagert. Vor und nach jedem Anreicherungs-schritt wurden Zellen abgenommen, um die Reinheit der einzelnen Fraktionen durchflusszytometrisch zu analysieren.

3.2.3.8.3 Bestrahlung der Mäuse

BALB/c-Empfängertiere wurden 1 Tag vor Transplantation mit 2 x 4,5 Gy am Bestrahlungsgerät Primus 2 der Abteilung für Strahlentherapie des Universitätsklinikum Regensburg im Abstand von 3 bis 4 h bestrahlt. Am nächsten Tag erfolgte die Transplantation.

3.2.3.8.4 Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen

Für die Transplantation wurde nach Zellzahlbestimmung der jeweiligen Zellfraktionen die gesamte benötigte Zahl an TZD Knochenmarkzellen und CD4⁺CD25⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ Zellen der Milz pro Gruppe berechnet. Knochenmarks- und Milzzellen wurden abzentrifugiert und in RPMI (5 % FCS) resuspendiert und die errechneten Zellzahlen so zusammenpipettiert, dass pro Maus 300 µl Zellsuspension injiziert wurde. Die Injektion erfolgte nach dem Erwärmen der Tiere unter einer Rotlichtlampe mit einer 1 ml Spritze und einer 0,4 mm Kanüle in die Schwanzvene der Maus.

3.2.3.8.5 Bewertung der GvHD

Die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Mäuse nach Transplantation erfolgte nach einem von Cooke und Kollegen eingeführten Bewertungsschema [249]. Dabei wurden der Zustand des Fells und der Haut, sowie Haltung, Mobilität und Gewicht der Mäuse berücksichtigt. Auf einer Skala von 0-2 pro Kriterium erhält man einen maximalen Wert von 10, bei dem die Tiere ein maximales Krankheitsbild zeigen würden. Nach den Tierschutzbestimmungen wurde für das verwendete Transplantationsmodell (C57BL/6 → BALB/c) zur Vermeidung unnötiger Belastungen das Bewertungsschema als Abbruchkriterium herangezogen. Erreichten die Tiere einen Wert von ≥ 6 , ist die GvHD so stark ausgeprägt, dass der Tod der Tiere zu erwarten ist. Daher wurden die Tiere ab einem GvHD Wert von 6 getötet und dieser Tag als Todestag in der Überlebensgrafik angegeben. Solche Tiere wurden mit maximalem Score (6) und maximalem Gewichtsverlust (25 %) in den Auswertungen weitergeführt.

3.2.3.9 Xenogenes Transplantationsmodell

3.2.3.9.1 Isolierung humaner Zellen

Humane PBMCs wurden am Vortag aufgetaut (3.2.1.3) und jeweils 400×10^6 Zellen in 40 ml cRPMI in einer 75 cm² Zellkulturflasche stehend üN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und über ein 70 µm Filter in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit cRPMI aufgefüllt, zentrifugiert (1200 rpm/10 min/4° C) und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und

die Zellzahl bestimmt. Gesamt-PBMCs wurden zunächst mit anti-Human-CD4-*beads* inkubiert und CD4⁺ T-Zellen mittels MACS (3.2.1.8) über eine LS-Säule angereichert. Die CD4⁺ T-Zellfraktion wurde mit cRPMI aufgefüllt und bis zur Transplantation auf Eis gelagert. Die CD4⁻-Fraktion wurde anschließend noch einmal über eine LS-Säule gegeben, um eine Kontamination der darauf folgenden Anreicherung CD8⁺ T-Zellen zu vermeiden. Im Anschluss wurde die CD4⁻-Fraktion mit anti-Human-CD8-*beads* inkubiert und ebenfalls über eine LS-Säule (3.2.1.8) separiert. Die CD4⁻CD8⁺ T-Zellfraktion wurde mit cRPMI aufgefüllt und bis zur Transplantation auf Eis gelagert. Die CD4⁻CD8⁻ Zellfraktion wurde ein zweites Mal über eine LS-Säule gegeben, um eine Kontamination mit CD8⁺ T-Zellen auszuschließen.

3.2.3.9.2 Bestrahlung der Mäuse

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Empfängertiere wurden am Tag der Transplantation mit 3,5 Gy am Bestrahlungsgerät Primus 2 der Abteilung für Strahlentherapie des Universitätsklinikum Regensburg bestrahlt. Im Abstand von 3-4 h erfolgte die Transplantation.

3.2.3.9.3 Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen

Soweit nicht anders angegeben wurden 20 x 10⁶ humane PBMCs verabreicht, die wie folgt zusammengesetzt wurden:

10 x 10 ⁶	CD4 ⁻ CD8 ⁻ PBMCs
6,7 x 10 ⁶	CD4 ⁺ T-Zellen
3,3 x 10 ⁶	CD8 ⁺ T-Zellen

Für die Transplantation wurde nach Zellzahlbestimmung der jeweiligen humanen Zellfraktionen die gesamte benötigte Zahl an PBMCs pro Gruppe berechnet. Für adoptive Transferexperimente wurden ruhiggestellte *in vitro* expandierte Treg-Subpopulationen (3.2.1.10) am Tag der Transplantation geerntet und mit PBMCs desselben Spenders transplantiert (Tkonv:Treg 1:1). Humane Zellpopulationen wurden abzentrifugiert, in PBS (5 % FCS) resuspendiert und die errechneten Zellzahlen so zusammenpipettiert, dass pro Maus 300 µl Zellsuspension injiziert wurde. Die Injektion erfolgte nach dem Erwärmen der Tiere unter einer Rotlichtlampe mit einer 1 ml Spritze und einer 0,4 mm Kanüle in die Schwanzvene der Maus.

3.2.3.9.4 Bewertung der xenogenen Erkrankung

Auch die Beurteilung des Gesundheitszustandes der RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse nach Transplantation erfolgte nach dem Beurteilungsschema für GvHD in Mäusen [249]. Dabei wurden der Zustand des Fells und der Haut, sowie Haltung, Mobilität und Gewicht der Mäuse berücksichtigt. Auf einer Skala von 0 bis 2 pro Kriterium erhält man einen maximalen Wert von 10, bei dem die Tiere ein maximales Krankheitsbild zeigen würden. Erreichen Tiere einen Wert von ≥ 6, ist die Erkrankung schon so stark ausgeprägt, dass der Tod der Tiere zu

erwarten ist. Daher wurden die Tiere ab einem GvHD Wert von 6 getötet und dieser Tag als Todestag in der Überlebensgrafik angegeben. Diese Tiere wurden mit maximalem Score (6) und maximalem Gewichtsverlust (25 %) in den Auswertungen weitergeführt.

3.2.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of mean*) angegeben. Für die statistische Analyse der klinischen und histologischen Scores wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Bei parametrischen Tests wie dem *student's t*-Test werden Normalverteilung und gleiche Standardabweichungen der betrachteten Gruppen vorausgesetzt. Für die statistische Analyse der Überlebenskurven wurde der log-rank Test verwendet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurden als statistisch

$p > 0,05$	nicht signifikant
$p < 0,05$	signifikant
$p < 0,01$	hochsignifikant
$p < 0,001$	extrem signifikant

erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Mausmodell der allogenen Knochenmarktransplantation

In dem von van Rijn und Kollegen beschriebenen xenogenen Transplantationsmodell wird durch den Transfer humaner PBMCs in BALB/c RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse eine xenogene Erkrankung ausgelöst, die mit der GvHD vergleichbar sein soll [234]. Um die Effekte humaner Zellen im xenogenen GvHD-Modell genauer beurteilen zu können, wurde als Vergleich zunächst die GvHD in BALB/c-Mäusen nach allogener Knochenmarktransplantation (KMT) untersucht. Des Weiteren wurden adoptive Transferexperimente mit murinen CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen durchgeführt, um deren suppressiven Wirkung auf die GvHD zu untersuchen. Diese Analysen sollten als Kontrolle für den adoptiven Transfer *in vitro* expandierter humaner Treg-Zellen im xenogenen Modell dienen.

4.1.1 Induktion der akuten GvHD nach allogener KMT

Als Referenz zur xenogenen GvHD in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen wurde ein murines Transplantationsmodell der akuten GvHD gewählt. Die GvHD wurde hierbei durch Kotransplantation MHC-differenten Spender-T-Zellen ausgelöst, die gegen Empfänger-MHC reagieren. MHC-Moleküle der Maus sind im H2-Lokus kodiert. Der MHC-Haplotyp definiert das Set aller MHC-Allele auf einem Chromosom und ist bei Inzuchtmäusen auf beiden Chromosomen gleich, während heterozygote Individuen zwei Haplotypen besitzen. Im allogenen Transplantationsmodell wurde das Knochenmark (KM) des Mausstammes C57BL/6 mit dem Haplotyp H-2^b in letal bestrahlte BALB/c-Mäuse mit dem Haplotyp H-2^d transplantiert, um so eine Rekonstitution der Spender-Hämatopoese im Empfängertier zu erreichen (**Abb. 4-1**). Ein Kotransfer konventioneller T-Zellen (Tkonv) des MHC-differenten Spenderstammes löst die GvH-Reaktion aus. In diesem Modell sind neben der MHC-Differenz die Stärke der Konditionierung sowie die Zahl der transplantierten T-Zellen für die Entstehung der GvHD entscheidend. Eine höhere Bestrahlungsdosis führt zu stärkerer Schädigung des Darmtraktes, verstärkter Zytokinausschüttung und damit zu schwererer GvHD [217]. Eine erhöhte T-Zellzahl bewirkt eine gesteigerte Alloreaktivität und damit ebenfalls stärkere GvHD.

Für die Untersuchungen wurden BALB/c-Empfängertiere letal (9 Gy) bestrahlt und mit 2,5 x 10⁶ T-Zell-depletierten (TZD) Knochenmarkzellen von C57BL/6-Spendertieren transplantiert. Tiere, die nur TZD KM bekamen dienten als GvHD-freie KM-Kontrollen, da ohne T-Zelltransfer keine GvHD zu erwarten war. Bestrahlte Tiere, die kein KM erhalten hatten, wurden zum Nachweis der Letalität der Strahlendosis mitgeführt (Bestrahlungskontrolle). Um

die bestrahlungsbedingte Toxizität zu mindern, wurden die Tiere im Abstand von 3 bis 4 Stunden mit 2x 4,5 Gy fraktioniert bestrahlt. Zur Induktion der GvHD wurden $2,5 \times 10^6$ konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus der Milz von C57BL/6-Mäusen isoliert und mit Knochenmarkszellen kotransplantiert (GvHD-Tiere). Das Überleben der Tiere wurde täglich überwacht und die Entwicklung der GvHD anhand eines klinischen Scores (s. 3.2.3.8.5) zweimal wöchentlich bestimmt.

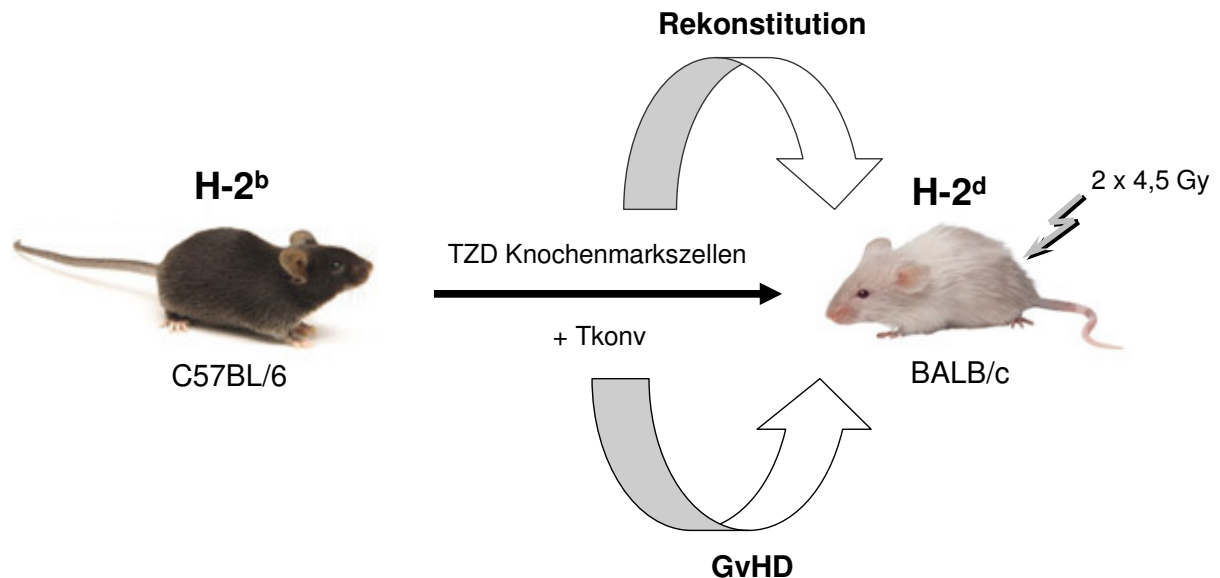


Abb. 4-1: Murines Modell der allogenen KMT und der akuten GvHD.

Knochenmarkszellen von C57BL6-Mäusen – Haplotyp H-2^b – wurden isoliert und nach Depletion der T-Zellen (T-Zell-depletiertes, TZD KM) in letal bestrahlte BALB/c-Mäuse – Haplotyp H-2^d – transplantiert. Ein Kotransfer immunkompetenter $CD4^+$ Tkonv-Zellen aus der Milz von C57BL/6-Mäusen sollte aufgrund der Unterschiede in den MHC-I- und MHC-II-Molekülen alloren aktiviert werden und letztendlich eine GvHD in den Empfängertieren auslösen.

Aufgrund der Strahlentoxizität verloren in den ersten Tagen nach Bestrahlung und Transplantation alle Behandlungsgruppen an Gewicht (**Abb. 4-2A**) und entwickelten einen leicht erhöhten Score (**Abb. 4-2B**). 21 Tage nach Transplantation normalisierte sich das Gewicht der KM-Kontrollen, während der klinische Score aufgrund strahlenbedingter Fellveränderungen noch leicht erhöht blieb. Im Gegensatz dazu nahmen bei GvHD-Tieren die klinischen Symptome ab Tag 21 rapide zu und erreichten 40 Tage nach Transplantation das Maximum. Klinische Zeichen der akuten GvHD waren dabei eine stark verminderte Aktivität, ein struppiges Fell, eine im Vergleich zu gesunden Tieren stark gekrümmte Körperhaltung (Kyphose) sowie rascher Gewichtsverlust und Diarrhö. **Abb. 4-2C** zeigt das Überleben der Versuchstiere. Erwartungsgemäß starben die Bestrahlungs kontrollen aufgrund der Knochenmarksaplasie innerhalb von 14 Tagen. KM-Kontrollen, die keine Anzeichen der GvHD entwickelt hatten, überlebten zu 100 %. Im Gegensatz dazu entwickelten Empfängertiere, die außer TZD KM auch $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen erhielten,

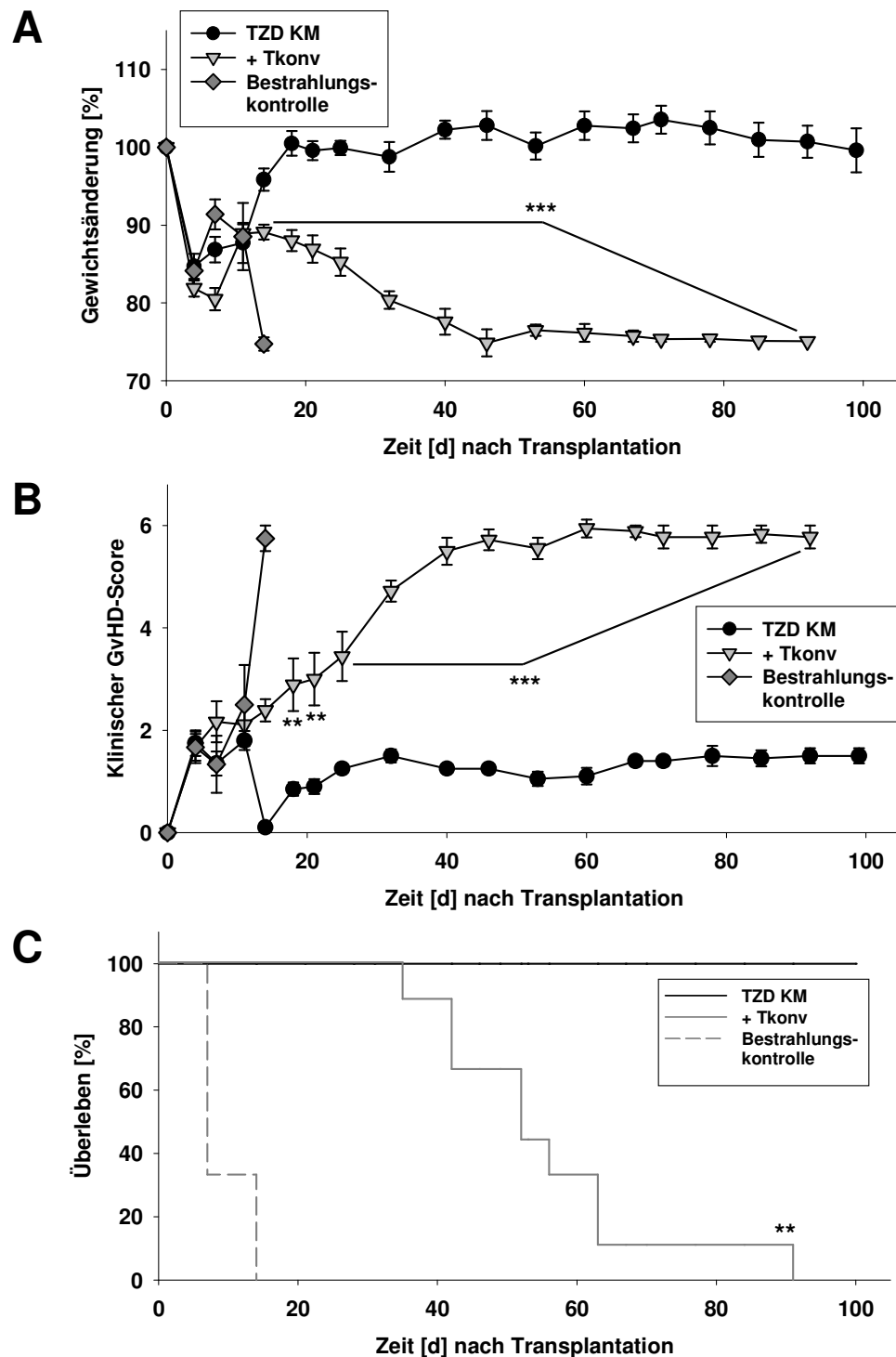


Abb. 4-2: Gewichtsverlauf, GvHD-Score und Überleben von BALB/c-Mäusen nach allogener KMT.

BALB/c-Empfängertiere wurden 1 Tag vor Transplantation mit $2 \times 4,5$ Gy fraktioniert bestrahlt. Aus C57BL/6-Mäusen wurden am Tag der Transplantation das KM sowie $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen aus der Milz isoliert. Die Empfängertiere wurden mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM (KM-Kontrollen) bzw. zusätzlich mit $2,5 \times 10^5$ $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen (GvHD-Tiere) von C57BL/6-Mäusen oder gar nicht (Bestrahlungskontrollen) transplantiert. Die Ermittlung des Gewichts (**A**) sowie die Bewertung der GvHD anhand eines klinischen GvHD-Scores (**B**) erfolgten zweimal wöchentlich. Das Überleben (**C**) der Tiere wurde täglich kontrolliert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-5 Tieren pro Gruppe ($n = 9-10$). Die Bestrahlungskontrolle hatte eine Gruppenstärke von 3 Tieren. Sterne kennzeichnen Unterschiede (**A** *student's t-Test*, **B** Mann-Whitney-Test bzw. **C** *log-rank-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gegenüber der KM-Kontrolle (TZD KM).

starke Anzeichen der GvHD, zeigten ab Tag 40 nach Transplantation eine hohe Mortalität und starben innerhalb des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen an den Folgen der Erkrankung ($p = 0,002$, *log-rank-Test*).

4.1.2 Chimärismus- und Rekonstitutionsanalysen

Zur Überprüfung des Anwachsens (Engraftment) der Spender-Hämatopoese wurden Chimärismusanalysen durchgeführt. Hierfür wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation Blutproben entnommen und durch Fluoreszenzmarkierung Linien- und MHC-spezifischer Oberflächenmoleküle der Anteil von Spenderzellen durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in **Abb. 4-3A** dargestellt, entwickelte sich 21 Tage nach Transplantation in allen transplantierten Gruppen ein fast vollständiger Spender-Chimärismus. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass Spender-T-Zellen das Engraftment des KM fördern [209], ist an Tag 21 der Anteil der H-2K^b-exprimierenden Zellen mit $96 \pm 0,7 \%$ im Vergleich zu den KM-Kontrollen ($87,2 \pm 5 \%$) in GvHD-Tieren höher. Diese Unterschiede resultierten aus einem höheren Spender-Chimärismus in der T-Zellreihe (**Abb. 4-3B**). So zeigten die Tiere der KM-Gruppe an Tag 21 eine variable Verteilung der H2-K^b-Expression innerhalb der T-Zellen ($66 \pm 15 \%$), während Tiere der GvHD-Gruppe einen kompletten T-Zell-Chimärismus

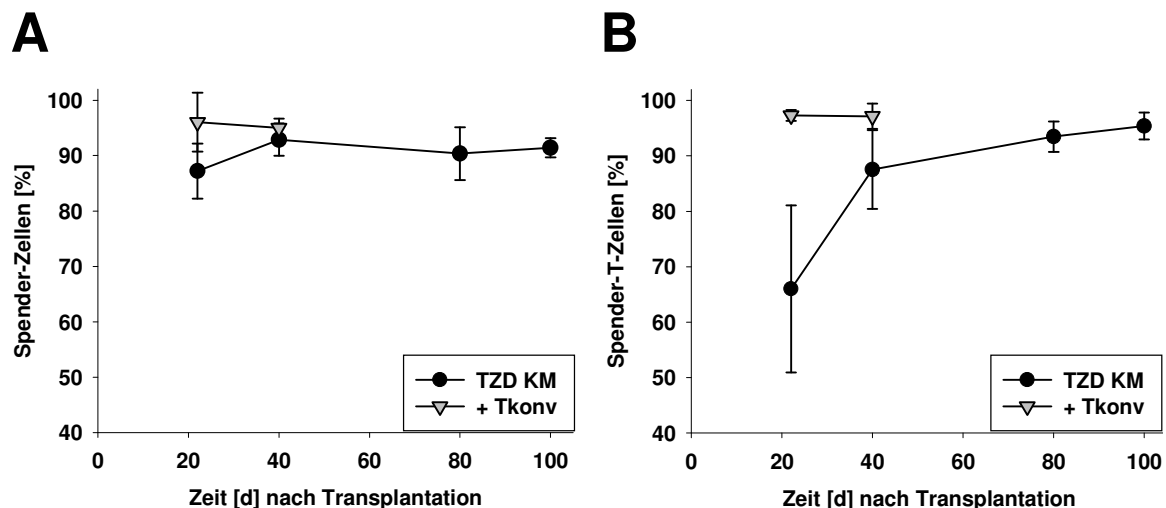


Abb. 4-3: Chimärismusanalyse von BALB/c-Mäusen nach allogener KMT.

21, 42, 80 und 101 Tage nach Transplantation wurde Tieren der verschiedenen Behandlungsgruppen Blut abgenommen und nach Erythrozyten-Lyse mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen das Spenderspezifische MHC-I-Molekül die Frequenz H-2K^b-exprimierender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **(A)** H-2K^b-Expression der mononukleären Blutzellen und **(B)** H2-K^b-Expression innerhalb der T-Zellreihe. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus einem repräsentativem Experiment ($n = 5$).

aufwiesen ($98 \pm 1 \%$). Der gemischte T-Zell-Chimärismus der KM-Kontrollen verlor sich im Beobachtungszeitraum und ging in einen vollständigen Spender-Chimärismus über.

Zur Analyse der hämatopoetischen Rekonstitution nach Transplantation wurde das periphere Blut (PB) hinsichtlich der Verteilung von H-2K^b-exprimierenden T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Monozyten untersucht. Als Kontrolle für die normale Verteilung der hämatopoetischen Zellpopulationen wurde das PB von naiven C57BL/6-Spendertieren verwendet. 21 Tage nach Transplantation lag der Anteil der T-Zellen in KM-Kontrollen und GvHD-Tieren deutlich unter Normalwerten (**Abb. 4-4A**). Während an Tag 42 das T-Zellkompartiment in KM-Kontrollen vollständig rekonstituiert war ($33,5 \pm 2,1 \%$), lag der Anteil

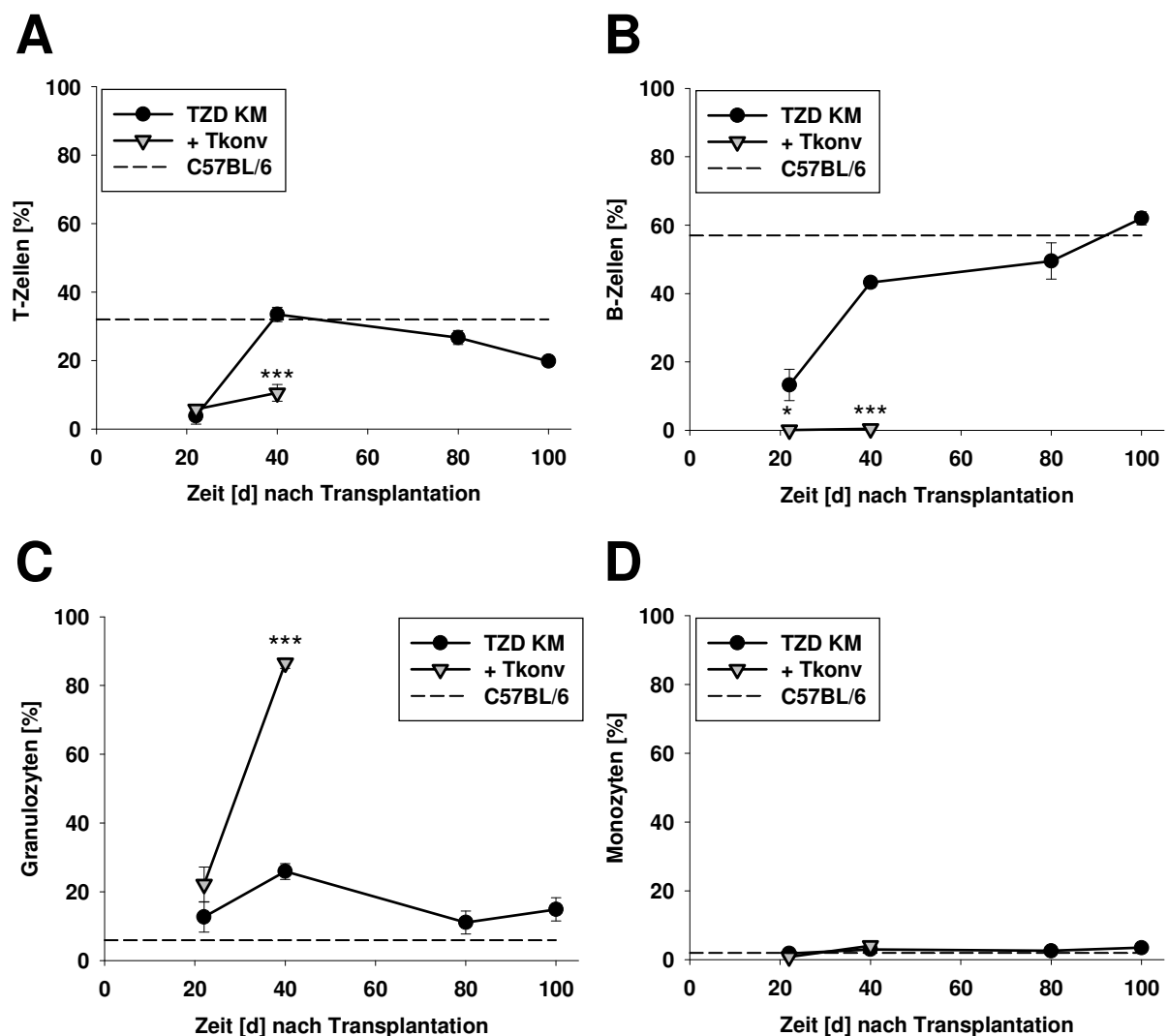


Abb. 4-4: Rekonstitution der Hämatopoese in BALB/c-Mäusen nach allogener KMT.

21, 42, 80 und 101 Tage nach Transplantation wurde Tieren der Behandlungsgruppen Blut abgenommen. Nach Erythrozyten-Lyse wurden PBMCs mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen TCR β , CD19, CD11b und Gr-1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Referenzwert diente das PB unbehandelter C57BL/6-Spendertiere (---). Die Rekonstitution wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten in Form des prozentualen Anteils H-2K^b-exprimierender (A) T-Zellen (TCR β ⁺), (B) B-Zellen (CD19⁺), (C) Granulozyten (CD11b⁺Gr-1⁺) und (D) Monozyten (CD11b⁺Gr-1⁺) unter den MNCs ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus einem repräsentativen Experiment ($n = 5$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (A-D *student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ gegenüber der KM-Kontrolle (TZD KM).

der T-Zellen bei GvHD-Tieren mit $10,5 \pm 2,4 \%$ im Vergleich zur KM-Kontrolle signifikant niedriger. Auch der Anteil der B-Zellen war an Tag 21 in KM-Kontrollen im Vergleich zu unbehandelten C57BL/6-Mäusen zunächst deutlich reduziert (**Abb. 4-4B**), erreichte jedoch innerhalb von 80 Tagen wieder Normalwerte. In GvHD-Tieren blieb dagegen der Anteil der B-Zellen an Tag 21 ($0,11 \pm 0,03 \%$) und Tag 42 ($0,5 \pm 0,3 \%$) im Vergleich zur KM-Kontrolle signifikant reduziert. Wie in **Abb. 4-4C** dargestellt, war der Anteil der Granulozyten in transplantierten Tieren an Tag 21 im Vergleich zu unbehandelten C57BL/6-Mäusen leicht erhöht. 42 Tage nach Transplantation zeigten Tiere der GvHD-Gruppe schon starke Anzeichen der Erkrankung (**Abb. 4-2C**) und hatten aufgrund der begleitenden Lymphopenie einen gegenüber den KM-Kontrollen ($26 \pm 2,3 \%$) signifikant erhöhten Granulozytenanteil ($86,5 \pm 1,5 \%$). Die Rekonstitution der Monozyten war sowohl in KM-Kontrollen als auch in GvHD-Tieren an Tag 21 vollständig und blieb über den Beobachtungszeitraum konstant (**Abb. 4-2D**).

4.1.3 Zielorgane der akuten GvHD

Um die pathophysiologischen Auswirkungen der GvHD zu untersuchen, wurden diverse Organe von GvHD-Tieren histologisch analysiert und infiltrierende Zellpopulationen durchflusszytometrisch charakterisiert.

Abb. 4-5 zeigt die Verteilung von B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und Monozyten im KM (**A**) und in der Milz (**B**) von GvHD-Tieren und von KM-Kontrollen, die länger als 100 Tage überlebt hatten. Die Gesamtzellzahl sowie die absoluten Zahlen von T-Zellen, Granulozyten bzw. Monozyten im KM von GvHD-Tieren zeigten gegenüber denen der KM-Kontrollen keine signifikanten Unterschiede. Die Zahl der B-Zellen in GvHD-Tieren ($0,023 \pm 0,023 \times 10^6$) war hingegen im Vergleich zu KM-Kontrolltieren ($8,6 \pm 1,6 \times 10^6$) um 99,7 % signifikant reduziert. Die Zellularität der Milz von GvHD-Tieren war um 89 % gegenüber den KM-Kontrollen vermindert. Die Abnahme der Milzzellzahl ist auf eine Reduktion von B- und T-Zellen in diesem Organ zurückzuführen. So enthielt die Milz von GvHD-Tieren um durchschnittlich 95 % weniger T-Zellen ($1,2 \pm 0,9 \times 10^6$) und 99,6 % weniger B-Zellen ($0,3 \pm 0,3 \times 10^6$) als die Milz der KM-Kontrollen. Zum Zeitpunkt der Analysen hatten alle GvHD-Tiere und KM-Kontrolltiere einen kompletten Spender-Chimärismus.

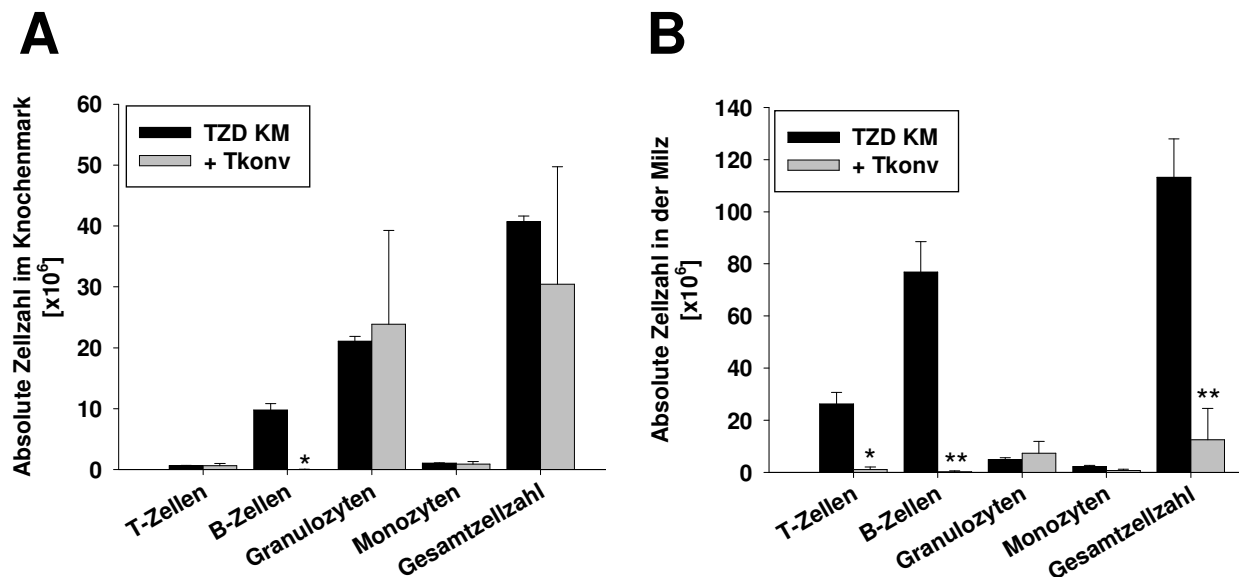


Abb. 4-5: Zelluläre Zusammensetzung des KM und der Milz von BALB/c-Mäusen nach allogener KMT.

KM (Femur und Tibia aus beiden Hinterläufen) und Milz wurden von Tieren mit starken klinischen Zeichen der GvHD präpariert und Zellsuspensionen hergestellt. Die Verteilung der hämatopoetischen Zellen wurde durch eine Färbung der KM- und Milzzellsuspensionen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen TCR β , CD19, CD11b und Gr-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten Tiere, die nach Transplantation von TZD KM den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen überlebt hatten. Absolutzahlen von T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten sowie Monozyten in (A) KM und (B) Milz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 4$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (A und B *student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle (TZD KM).

Die wichtigsten Zielorgane der akuten GvHD sind Darm, Haut und Leber [250]. Deshalb wurden diese Organe aus GvHD-Tieren zu einem Zeitpunkt starker Krankheitsanzeichen präpariert und in Formalin fixiert. Histopathologische Untersuchungen wurden nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) durchgeführt.

Im Vergleich zur KM-Kontrolle zeigten sich deutliche Veränderungen in diesen Organen bei an GvHD erkrankten Tieren. Während die Haut der KM-Kontrollen eine unauffällige Histologie zeigte, war in GvHD-Tieren eine epidermale Atrophie zu beobachten (Abb. 4-6A). Die Veränderungen der Haut konnten bei stark erkrankten Tieren auch makroskopisch in Form von Schuppungen und Erythemen festgestellt werden. Pathologische Veränderungen der Leber (Abb. 4-6B) zeigten sich in Form von parenchymalen lymphozytären Infiltraten (schwarze Pfeile), massiver entzündlicher Infiltrate der Gallengänge sowie ödematöser Gewebeveränderungen. Des Weiteren konnten im Vergleich zu KM-Kontrollen eine Reduktion und Verengung der Lebersinusoiden festgestellt werden. Im späten Stadium der Erkrankung entwickelten GvHD-Tiere klinisch eine starke Diarrhö sowie in schweren Fällen einen rektalen Prolaps. Erwartungsgemäß zeigten sich auch im Darm histopathologische Veränderungen. Bei der Präparation des Kolons waren bereits makroskopisch Veränderungen in GvHD-Tieren erkennbar, da es stark verdickt, verhärtet und verkürzt war. Die Untersuchung der Gewebeschnitte von GvHD-Tieren ergab eine transmurale Infiltration des

Kolons mit Lymphozyten (**Abb. 4-6C**) sowie eine Kryptenzellapoptose bis hin zum vollständigen Verlust der Kryptenarchitektur.

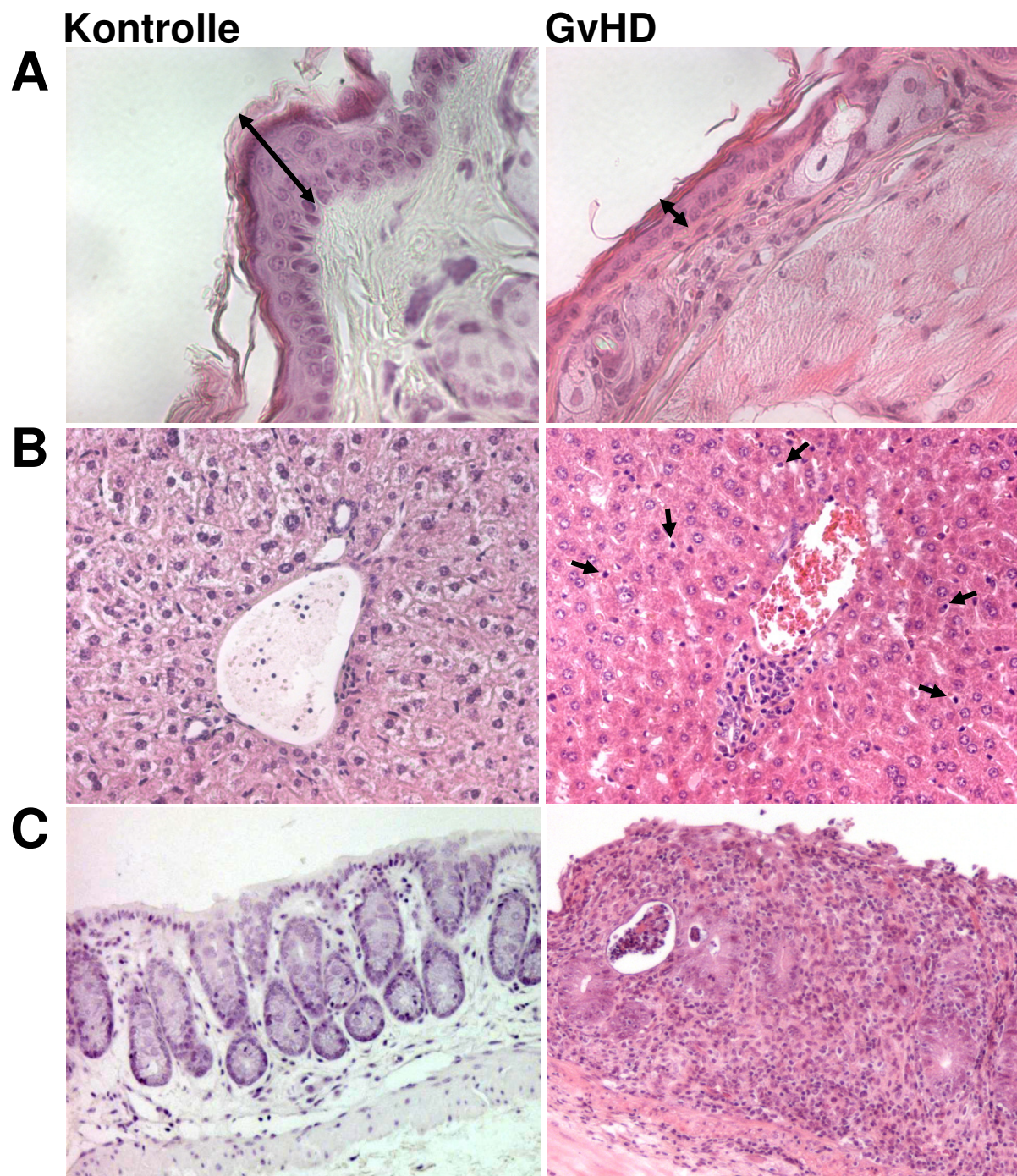


Abb. 4-6: Histologie der Haut, der Leber und des Darms von BALB/c Mäusen nach allogener KMT.

Paraffinschnitte von Haut (**A**), Leber (**B**) und (**C**) Darm wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Histologie einer GvHD-freien BALB/c Maus, die mit TZD KM transplantiert wurde (linke Spalte), im Vergleich zu einer an GvHD erkrankten Maus (rechte Spalte). Aufnahmen entstanden in 200-facher Vergrößerung (A und B) bzw. 100-facher Vergrößerung (C). Doppelpfeile markieren die Schichtdicke der Epidermis; einfache Pfeile markieren Lymphozyten im Leberparenchym.

4.1.4 Suppressive Aktivität muriner CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen *in vitro*

Um die Unterdrückung alloreaktiver T-Zellen durch murine CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in dieser Stammkombination zu überprüfen, wurden gemischte Leukozyten-Reaktionen (*mixed leucocyte reaction*, MLR) durchgeführt (**Abb. 4-7**). Die allogene Immunantwort wird dabei durch die Kokultivierung von Tkonv-Zellen der C57BL/6-Maus mit Stimulatorzellen aus dem MHC-I- und II-differenten BALB/c-Mausstamm ausgelöst.

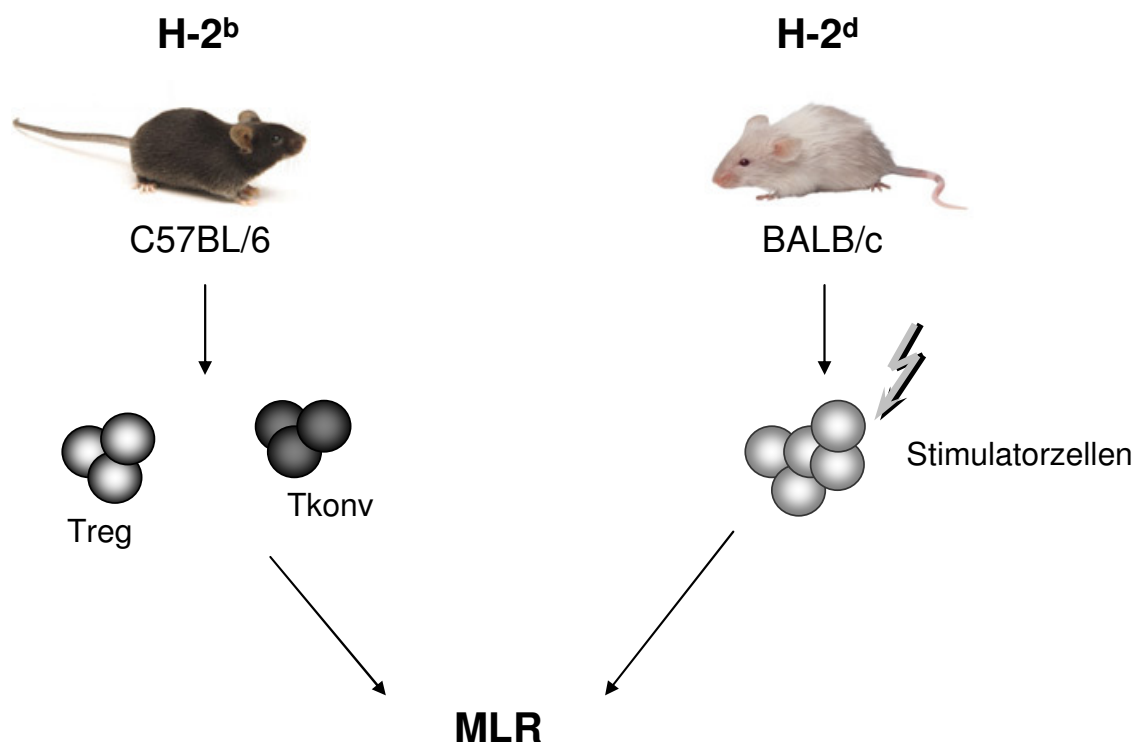


Abb. 4-7: Schema des Versuchsaufbaus zur Analyse der suppressiven Aktivität muriner CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in der MLR.

CD4⁺CD25⁺ Treg- und CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen wurden aus der Milz von C57BL/6-Mäusen isoliert und mit allogenen Stimulatorzellen von BALB/c-Mäusen in einer MLR kokultiviert. Als Stimulatoren dienen T-Zell-depletierte Milzzellen, die vorwiegend Zellen mit antigenpräsentierenden Eigenschaften enthalten. Tkonv-Zellen und Treg-Zellen sollten in der Kokultur mit Stimulatorzellen aufgrund der Unterschiede in den MHC-I- und MHC-II-Molekülen alloren aktiviert werden. Um eine Proliferation der Stimulatorzellen zu verhindern, wurden diese mit 30 Gy bestrahlt.

Dazu wurden aus der Milz von C57BL/6-Mäusen sowohl CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen als auch CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen zunächst über MACS angereichert und anschließend durchflusszytometrisch zu einer Reinheit von > 95 % aufgereinigt (**Abb. 4-8**).

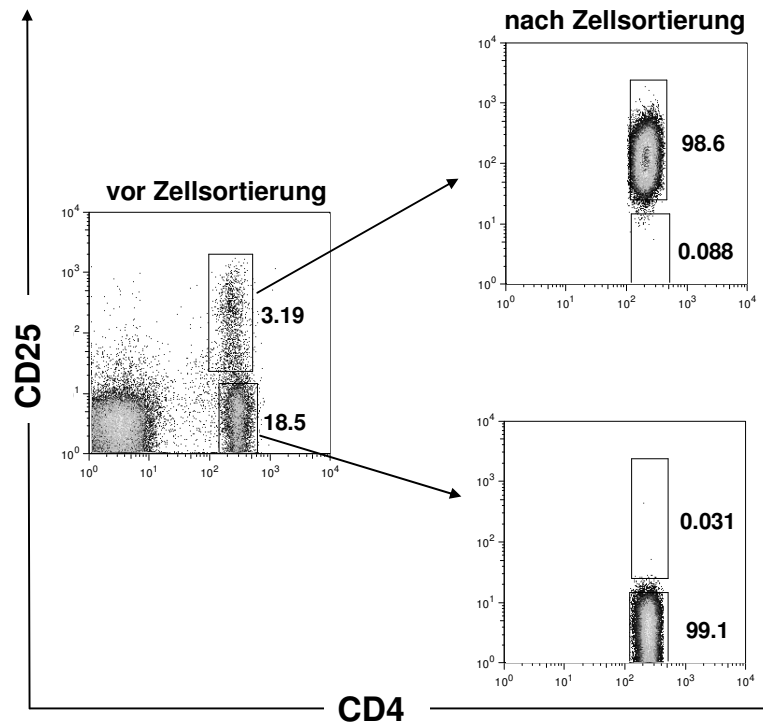


Abb. 4-8: Reinheitsgrad der FACS-aufgereinigten $CD4^+CD25^+$ - und $CD4^+CD25^-$ -Zellpopulation.

CD25-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen der Milz einer adulten C57BL/6-Maus vor Zellsortierung. Die Gesamtmilzzellen wurden mit immunomagnetischen *beads* gegen CD25 mittels magnetischer Zellseparation (MACS) separiert. Die CD25positiv- und CD25negativ-Fractionen wurden nach Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4 durchflusszytometrisch zu einer Reinheit von > 98 % aufgereinigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Stimulatorzellen wurden durch T-Zell-Depletion der Milzzellen von BALB/c-Mäusen gewonnen und vor Kokultivierung bestrahlt, um ihre Proliferation auszuschließen. Die Proliferation von T-Zellen wurde nach Einbau von radioaktivem 3H -Thymin in sich teilende Zellen mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

Konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen reagierten 5 Tage nach Kokultur mit allogenen Stimulatorzellen mit einer starken proliferativen Antwort (23823 ± 783 cpm) (**Abb. 4-9**). Im Einklang mit der Beobachtung, dass Treg-Zellen auf TCR-Stimulation *in vitro* hyporesponsiv bzw. anerg sind [140], zeigte auch die $CD4^+CD25^+$ Zellpopulation in Anwesenheit allogener Stimulatoren keine Proliferation. Sie waren jedoch in der Lage die Proliferation der Tkonv-Zellen dosisabhängig zu supprimieren. So war die Proliferation der $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen in Kokultur mit $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen im Verhältnis 1:1 um 86 % (3283 ± 1114 cpm) und im Verhältnis 1:4 um 73 % (6253 ± 1358 cpm) signifikant reduziert. Eine Zugabe von Tkonv-Zellen im Verhältnis 1:1 führte zu keiner Reduktion der proliferativen Antwort, sondern bewirkte eine Zunahme der Proliferation um 70 % (33767 ± 3866 cpm). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die verminderte Proliferation in Anwesenheit der $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen auf unspezifische Effekte, wie etwa einer Überladung der Zellkultur, zurückzuführen waren. Die Titration des Tkonv:Treg-Verhältnisses bewirkte eine Zunahme

der Proliferation der Tkonv-Zellen, so dass bei einem Verhältnis von 8:1 oder 16:1 (Tkonv:Treg) keine signifikante Suppression mehr zu beobachten war.

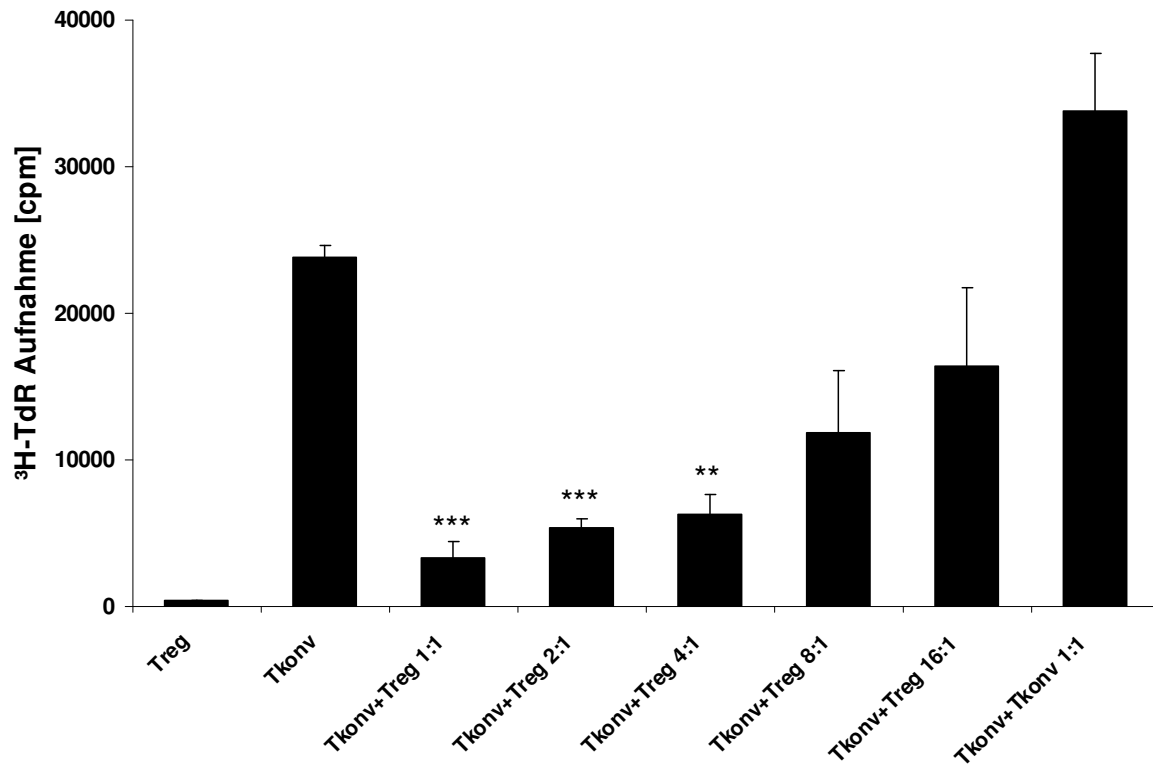


Abb. 4-9: Dosisabhängige Suppression der Proliferation alloreaktiver CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in der MLR.

1×10^5 CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen wurden mit 1×10^5 bestrahlten (30 Gy) Stimulatorzellen kokultiviert. CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen bzw. CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen wurden in den angegebenen Verhältnissen zugegeben. 5 Tage nach Kokultur wurde ³H-Thymidin zugegeben und nach weiteren 16 Stunden die Proliferation mittels eines β -Szintillationszählers bestimmt. Dargestellt ist der Einbau von ³H-Thymidin der Zellen als Mittelwerte der cpm \pm SEM ($n = 3$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (*student's t*-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle (Tkonv).

4.1.5 Suppressive Aktivität muriner CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen *in vivo*

Wie in der MLR nachgewiesen wurde, ist der Wirkungsgrad der Suppression alloreaktiver Tkonv-Zellen abhängig von der Zahl zugesetzter Treg-Zellen. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass der Kotransfer von Tkonv- und Treg-Zellen im physiologischen Verhältnis (10:1) im murinen GvHD-Modell nur geringe protektive Wirkung hat [221]. Um die suppressive Aktivität *in vivo* zu untersuchen, wurden im Mausmodell der akuten GvHD daher CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen im Verhältnis 1:1 mit Tkonv-Zellen transplantiert. Dazu wurden aus der Milz von C57BL/6-Mäusen sowohl CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen als auch CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen isoliert und zusammen mit TZD KM in letal bestrahlte BALB/c-Empfängertiere transferiert. Als Kontrollen dienten Tiere, die nur TZD KM bekommen hatten (KM-Kontrolle), Tiere mit TZD KM plus Tkonv-Zellen (GvHD-Tiere bzw. Positiv-Kontrolle) und Tiere mit TZD KM plus Treg-Zellen (Treg-Kontrolle), um eine GvH-Induktion durch Treg-Zellen auszuschließen.

Wie aus **Abb. 4-10A** und **B** ersichtlich, entwickelten auch Mäuse nach Kotransfer von CD4⁺CD25⁻ Tkonv-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zwischen Tag 21 und Tag 40 diskrete Zeichen der GvHD und verloren an Gewicht, während sich KM- und Treg-Kontrollen von der Strahlentoxizität rasch wieder erholten. Im Vergleich zu GvHD-Tieren war jedoch der klinische GvHD-Score sowie der Gewichtsverlust nach adoptivem Transfer CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen signifikant niedriger. Über den weiteren Beobachtungszeitraum verbesserte sich der Zustand der Tiere kontinuierlich, wobei ein Großteil von ihnen 100 Tage nach Kotransplantation normales Gewicht erreichten und kaum noch klinische Zeichen der GvHD aufwiesen. Tiere, die TZD KM plus Treg-Zellen erhielten, überlebten ebenso wie KM-Kontrollen zu 100 % (**Abb. 4-10C**). Im Gegensatz dazu verstarben GvHD-Tiere innerhalb von 100 Tagen. Erwartungsgemäß führte der adoptive Transfer CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zu einem Schutz vor letaler GvHD, wobei 78 % der Tiere den Beobachtungszeitraum überlebten ($p = 0,005$, *log-rank-Test*).

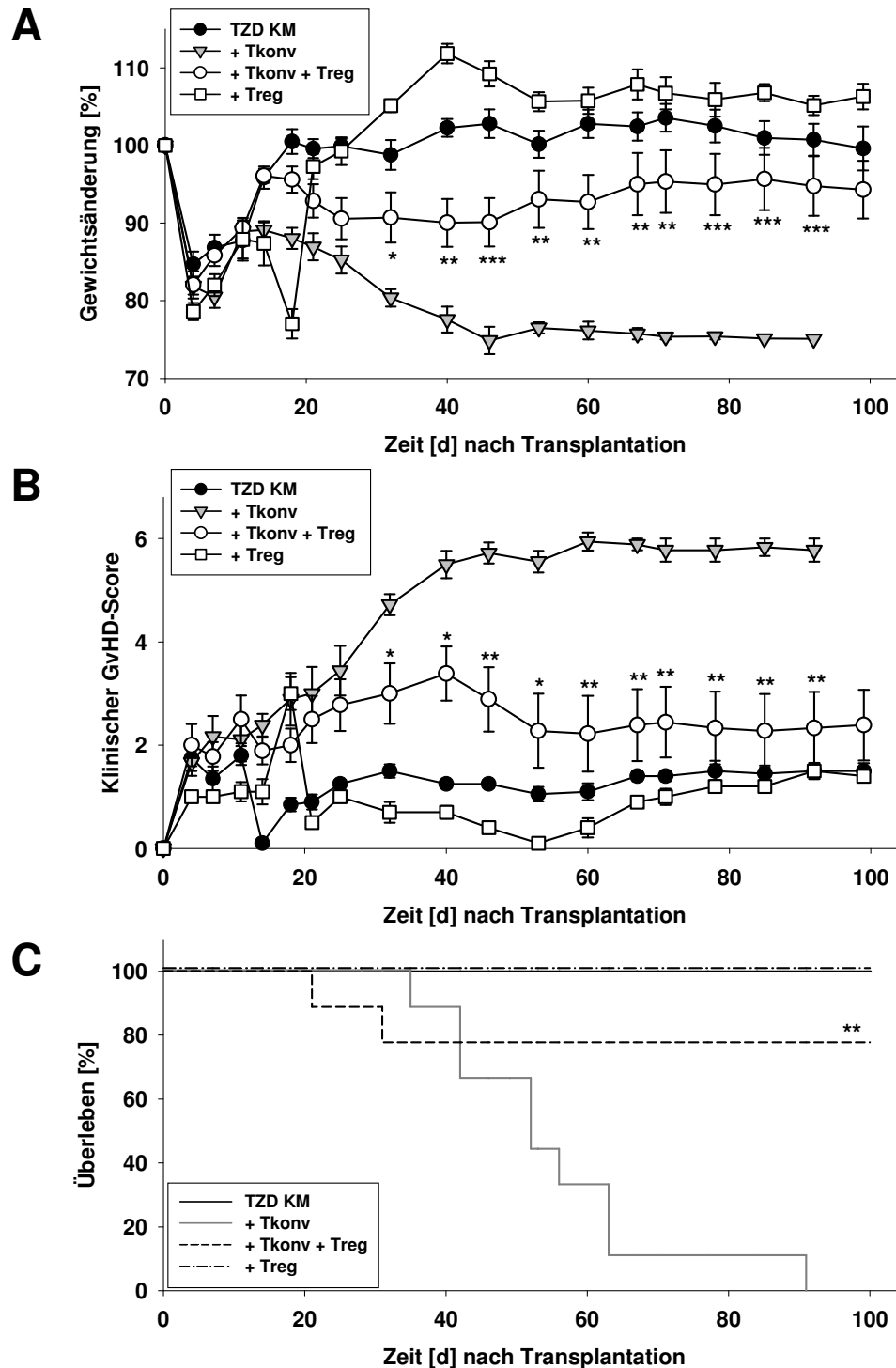


Abb. 4-10: Gewichtsverlauf, GvHD-Score und Überleben nach adoptivem Transfer $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen.

BALB/c-Empfängertiere wurden 1 Tag vor Transplantation mit $2 \times 4,5$ Gy bestrahlt. Aus C57BL/6-Mäusen wurde das KM sowie aus der Milz $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen und $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen isoliert. Empfängertiere wurden mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM (KM-Kontrolle), mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM plus $2,5 \times 10^5$ $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen (GvHD-Tiere), mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM plus $2,5 \times 10^5$ $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen (Treg-Kontrolle) und mit $2,5 \times 10^6$ TZD KM plus $2,5 \times 10^5$ $CD4^+CD25^-$ Tkonv-Zellen plus $2,5 \times 10^5$ $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen transplantiert. Die Ermittlung des Gewichts (A) sowie die Bewertung der GvHD (B) erfolgten 2x pro Woche. Das Überleben (C) der Tiere wurde täglich kontrolliert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-5 Tieren pro Gruppe ($n = 9-10$). Die Treg-Kontrolle hatte lediglich eine Gruppenstärke von 5 Tieren. Sterne kennzeichnen Unterschiede (A *student's t-Test*, B Mann-Whitney-Test bzw. C *log-rank-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gegenüber GvHD-Tieren.

Des Weiteren wurde anhand durchflusszytometrischer Analysen des PB die Rekonstitution hämatopoetischer Zellen der verschiedenen Behandlungsgruppen im Zeitverlauf untersucht (**Abb. 4-11A-D**). Die Rekonstitution von T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten sowie Monozyten verlief in Treg-Kontrolltieren ähnlich wie in KM-Kontrollen und die Tiere zeigten ab Tag 42 weitgehend Normalwerte, lediglich die B-Zell-Rekonstitution war leicht verzögert (Tag 80). Mäuse, die neben Tkonv-Zellen $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen erhalten hatten zeigten zunächst ähnlich wie GvHD-Tiere an Tag 42 eine Reduktion der B- und T-Zellen, während der Anteil der Granulozyten prozentual deutlich über dem der KM-Kontrolltiere lag. Wie aus **Abb. 4-**

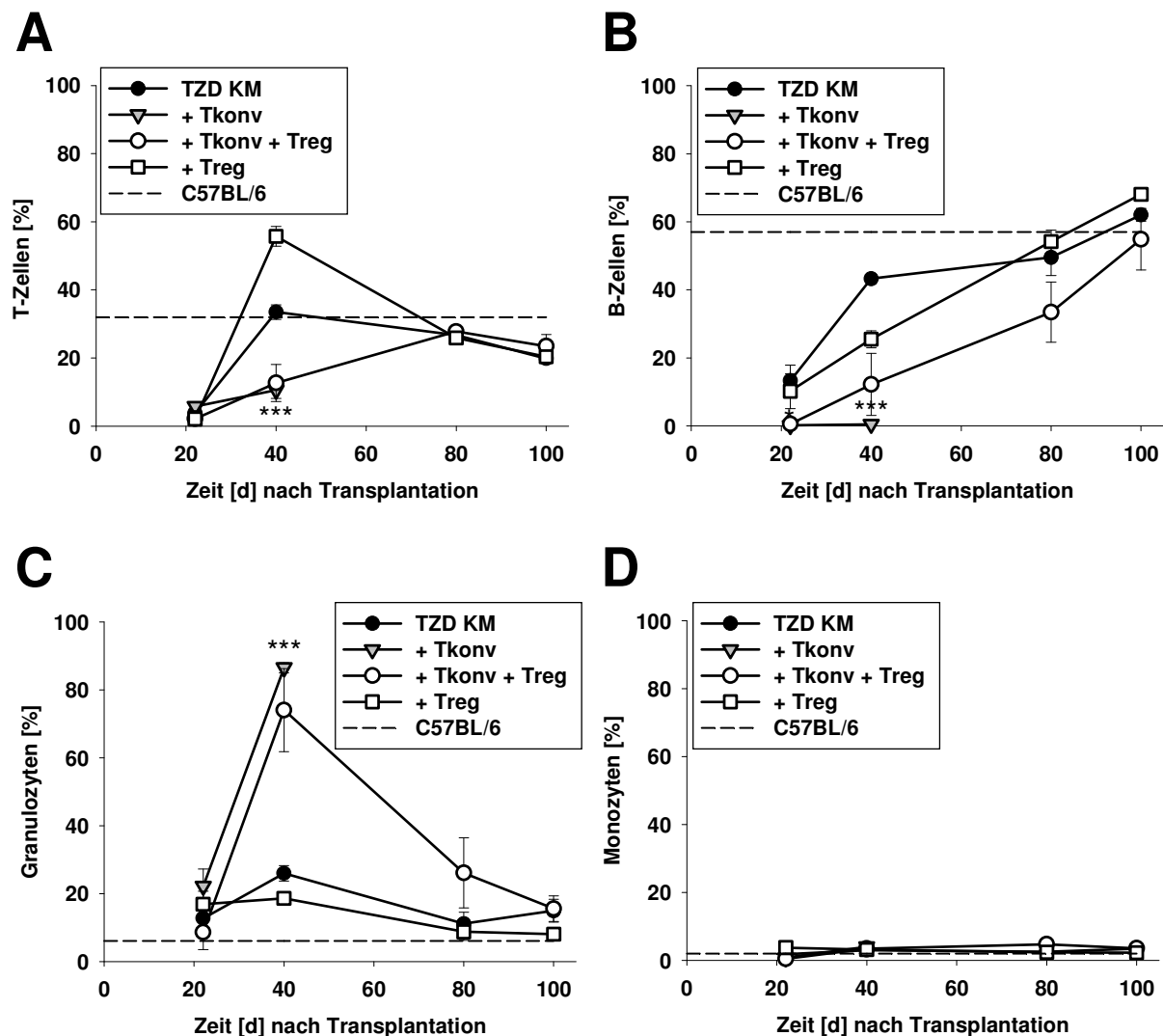


Abb. 4-11: Rekonstitution der Hämatopoese nach adoptivem Transfer $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen.

21, 42, 80 und 101 Tage nach Transplantation wurde Tieren der verschiedenen Behandlungsgruppen Blut abgenommen. Nach Lyse der Erythrozyten wurden PBMCs mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen TCR β , CD19, CD11b und Gr-1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Referenz diente das PB unbehandelter C57BL/6-Spendertiere (---). Die Rekonstitution wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten in Form des prozentualen Anteils H-2K^b-exprimierender (**A**) T-Zellen (TCR β^+), (**B**) B-Zellen (CD19⁺), (**C**) Granulozyten (CD11b⁺Gr-1⁺) und (**D**) Monozyten (CD11b⁺Gr-1⁺) innerhalb der MNCs ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus einem repräsentativen Experiment ($n = 5$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (**A-D** *student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit *** $p < 0,001$ gegenüber der KM-Kontrolle (TZD KM).

10C ersichtlich, entwickelten die Tiere zu diesem Zeitpunkt milde Zeichen einer GvHD. Mit dem Abklingen der klinischen Symptome stieg der Anteil von T- und B-Zellen wieder auf Normalwerte.

Die zelluläre Zusammensetzung des KM und der Milz von Tieren, die nach adoptivem Transfer $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen vor letaler GvHD geschützt waren, wurde 100 Tage nach Transplantation durchflusszytometrisch analysiert. Die Gesamtzellzahl sowie die Absolutzahlen der T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Monozyten zeigten sowohl im KM (**Abb. 4-12A**) als auch in der Milz (**Abb. 4-12B**) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu denen der KM-Kontrollen. Im Gegensatz dazu bewirkte die GvHD eine signifikante Reduktion sowohl der Zellularität der Milz (T- und B-Zellen vermindert) als auch der B-Zellzahl im KM.

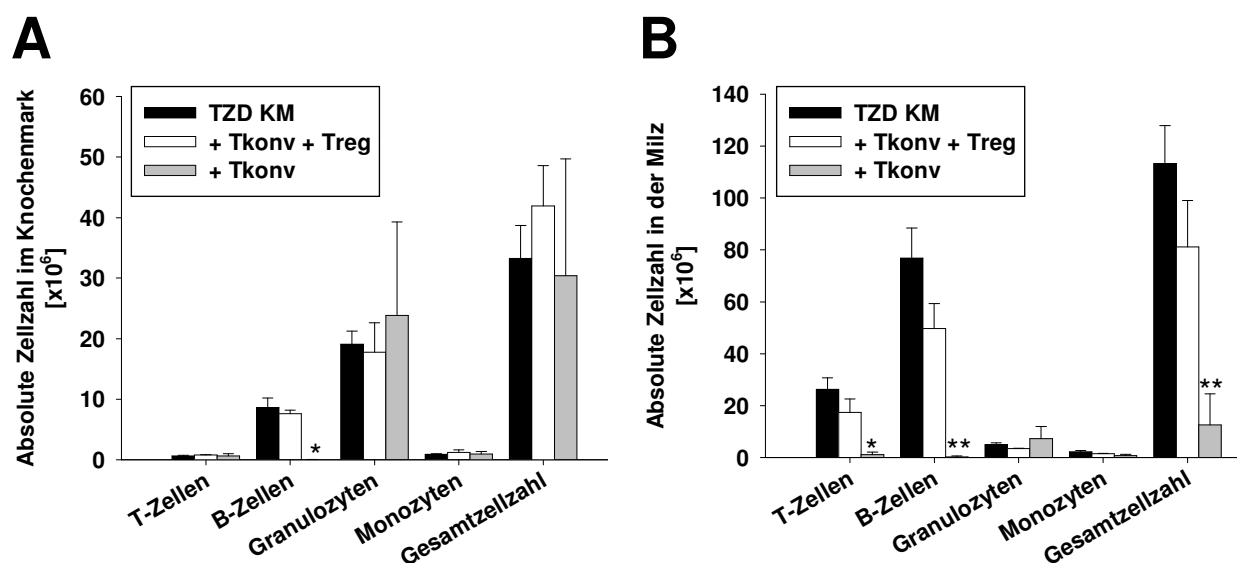


Abb. 4-12: Zelluläre Zusammensetzung des KM und der Milz nach adoptivem Transfer $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen.

KM (Femur und Tibia aus beiden Hinterläufen) und Milzen wurden von GvHD-Tieren mit starken klinischen Zeichen der GvHD präpariert und Zellsuspensionen hergestellt. Die nach adoptivem Transfer vor GvHD geschützten Tiere wurden 100 Tage nach Transplantation analysiert. Die Verteilung der hämatopoetischen Zellpopulationen wurde durch Färbung der KM- und Milzzellsuspensionen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen TCR β , CD19, CD11b und Gr-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen dienten Tiere, die nach Transplantation von TZD KM den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen überlebt hatten. Absolutzellzahlen von T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten sowie Monozyten im (A) KM und (B) der Milz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 2-4$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (A und B *student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ gegenüber der KM-Kontrolle (TZD KM).

Die histopathologische Untersuchung ergab im Vergleich zur KM-Kontrolle keine pathologisch relevanten Veränderungen in Organen der durch adoptiven Transfer von $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen vor GvHD geschützten Tiere. So zeigte der Darm eine intakte Kryptenarchitektur sowie nur minimal lymphozytäre Infiltrate (**Abb. 4-13C**) und die Epidermis war ähnlich hoch aufgebaut wie in Kontrolltieren (**Abb. 4-13A**). In der Leber konnten

lymphozytäre Infiltrate des Parenchyms festgestellt werden (**Abb. 4-13B**), jedoch wurden keine entzündlichen Infiltrate oder ödematöse Veränderungen der Gallengänge beobachtet.

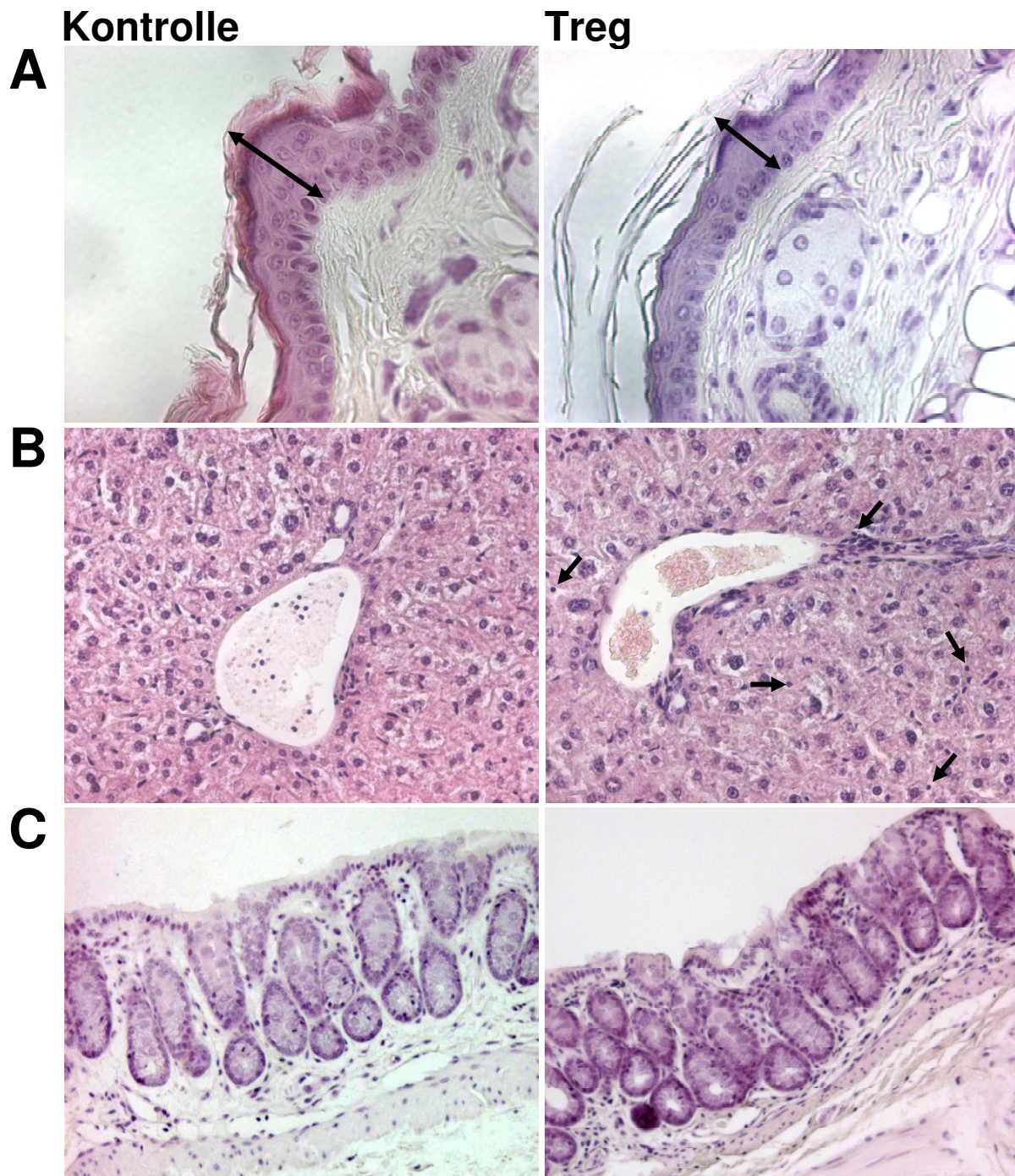


Abb. 4-13: Histologie der Haut, der Leber und des Darms von BALB/c Mäusen nach adoptivem Transfer $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen.

Paraffinschnitte von Haut (**A**), Leber (**B**) und (**C**) Darm wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Histologie einer mit TZD KM transplantierten Maus (linke Spalte) im Vergleich mit der einer Maus die neben TZD KM zusätzlich Tkonv und Treg-Zellen erhalten hatte (rechte Spalte) an Tag 100 nach Transplantation. Aufnahmen entstanden in 200-facher Vergrößerung (A und B) bzw. 100-facher Vergrößerung (C). Doppelpfeile markieren die Schichtdicke der Epidermis; einfache Pfeile markieren Lymphozyten im Leberparenchym.

Diese Daten bestätigen, dass der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen das klinische Bild der GvHD nach allogener KMT mindert, die Rekonstitution der Hämatopoese fördert, die GvHD-assoziierte Pathologie in Darm, Haut und Leber verhindert und dadurch die Tiere vor der letalen Erkrankung schützt.

4.2 Charakterisierung *in vitro* expandierter humaner Treg-Zellen

Im Gegensatz zur Maus enthält die CD25⁺ Population humaner PBMCs neben natürlichen Treg-Zellen auch kürzlich aktivierte T-Zellen, die über eine intermediäre Expression der IL-2R α -Kette (CD25) verfügen (CD25^{int}). Natürliche Treg-Zellen zeichnen sich dagegen durch eine sehr hohe Expression von CD25 aus und sind deshalb in der CD25^{high}-Population der CD4⁺ T-Zellen angereichert [251]. **Abb. 4-14A** zeigt die Expression von CD25 auf CD4⁺ Zellen humaner PBMCs sowie deren Aufteilung in CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} und

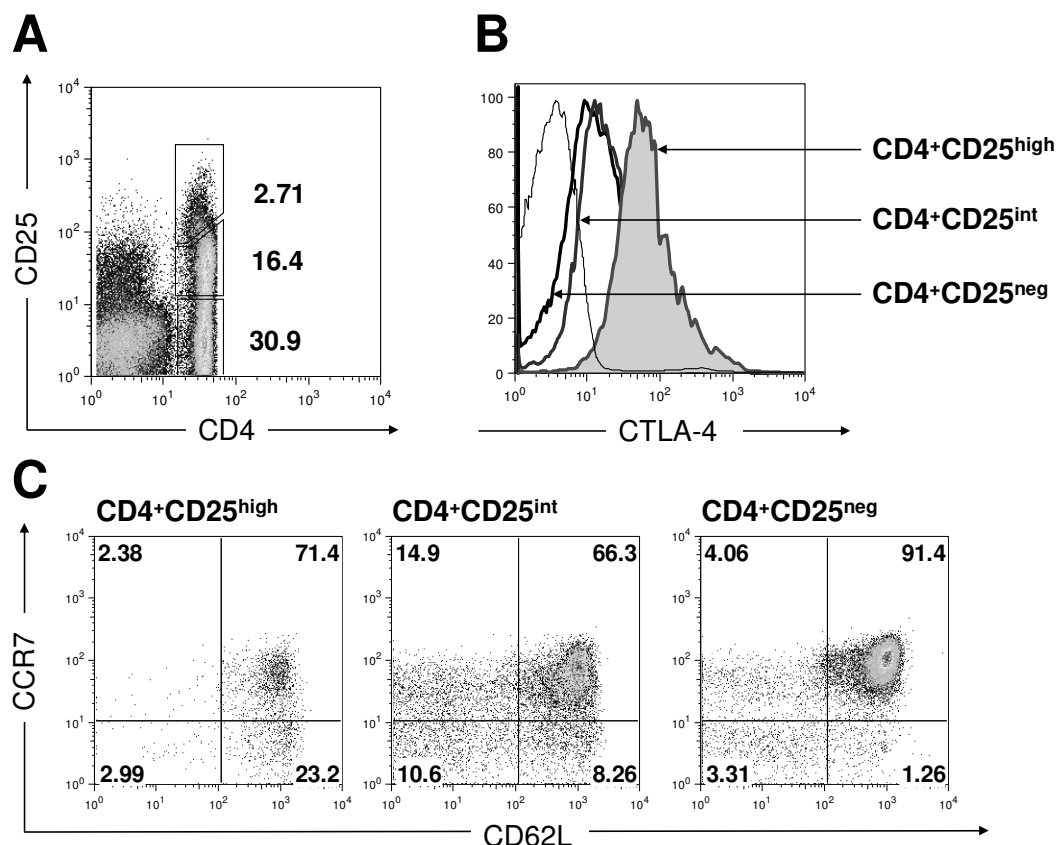


Abb. 4-14: Phänotyp humaner natürlich vorkommender Treg-Zellen im PB.

PBMCs eines gesunden freiwilligen Spenders wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD25, CCR7, CD62L und CTLA-4 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** CD25 Expression auf peripheren CD4⁺ T-Zellen. **(B)** Intrazelluläre CTLA-4 Expression in der CD4⁺CD25^{high} (volles Profil), CD4⁺CD25^{int} (graue Linie) und CD4⁺CD25^{neg} (schwarze Linie) Population. Der Isotyp des Antikörpers diente als Kontrolle (dünne Linie). **(C)** Expression der Lymphknoten-homing-Rezeptoren CCR7 und CD62L in der CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg} Population.

CD4⁺CD25^{neg} Subpopulationen. Gegenüber der CD4⁺CD25^{int} T-Zell-Population setzt sich die CD4⁺CD25^{high} T-Zellpopulation durch eine leicht verminderte CD4-Expression ab. Ebenso wie ihre murinen Pendanten [105] zeigen humane CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen im Vergleich zu konventionellen CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen eine erhöhte CTLA-4 Expression (**Abb. 4-14B**). Der Chemokinrezeptor 7 (CCR7) sowie das Zelladhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) sind wichtige Faktoren für das *homing* von T-Zellen in den Lymphknoten, das, wie im Mausmodell gezeigt wurde, eine wichtige Voraussetzung für die suppressive Wirkung von natürlichen Treg-Zellen *in vivo* ist [223, 252, 253]. Wie aus **Abb. 4-14C** ersichtlich, zeigt die CD4⁺CD25^{neg} Population humaner PBMCs eine einheitliche Koexpression von CCR7 und CD62L (91,4 %), während die CD4⁺CD25^{high} (71,4 %) und CD4⁺CD25^{int} (66,3 %) Population CCR7 und CD62L heterogener koexprimieren.

Die Frequenz humaner CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen im peripheren Blut ist mit 1-3 % der mononukleären Zellen sehr gering (**Abb. 4-14A**), was potentielle klinische Anwendungen dieser Zellen erschwert. In unserer Arbeitsgruppe wurden deshalb Protokolle zur effizienten *in vitro* Expansion humaner natürlicher Treg-Zellen entwickelt, die auf der polyklonalen Zellstimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern beruhen (s. 3.2.1.10).

4.2.1 FOXP3-Expression in humanen CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen vor und nach Expansion

Ein großes Problem für die Charakterisierung natürlicher Treg-Zellen ist, dass – wie bereits erwähnt (s. 1.3.2.2) – viele der in Treg-Zellen konstitutiv exprimierten Moleküle wie z.B. CD25 oder CTLA-4 nach Aktivierung auch auf Tkonv-Zellen exprimiert werden und somit eine eindeutige Differenzierung der Treg-Zellen von aktivierten Zellen schwierig ist. Der bisher zuverlässigste Marker für CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen ist der Transkriptionsfaktor Foxp3, dem eine entscheidende Bedeutung für die Reifung von Treg-Zellen im Thymus sowie der Entwicklung ihrer suppressiven Eigenschaften zugeschrieben wird (s. 1.3.2.1). Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit kein monoklonaler Antikörper für durchflusszytometrische FOXP3-Analysen existierte, wurde die FOXP3-Expression auf mRNA-Ebene quantifiziert.

Um zu untersuchen, inwieweit sich die FOXP3-Expression in den CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen in Abhängigkeit vom CD25-Expressionslevel unterscheidet, wurde das PB sechs verschiedener gesunder Spender analysiert. Dazu wurde die FOXP3 mRNA-Expression der sortierten T-Zell-Subpopulationen mittels *real-time* PCR quantifiziert. Auf transkriptioneller Ebene zeigten CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen eine um 365-fach erhöhte FOXP3-Expression gegenüber CD4⁺CD25^{neg} Zellen sowie ein um 6,7-fach erhöhtes FOXP3 mRNA-Level gegenüber CD4⁺CD25^{int} Zellen (**Abb. 4-15A**). Das transkriptionelle Expressionsmuster spiegelte sich auch auf Proteinebene wider. So konnte mittels Western-Blot-Analyse eine deutlich stärkere FOXP3 Proteinexpression in CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen im Vergleich zu

CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg} Zellen detektiert werden (**Abb. 4-15B**). Die Western-Blot-Analyse zeigte auch, dass das humane FOXP3 im Unterschied zum Foxp3 Protein der Maus zwei Isoformen besitzt. Die obere Bande repräsentiert das Ortholog zum murinen Foxp3, während die untere Bande von einer Splice-Variante der FOXP3 mRNA gebildet wird, der das Exon 2 fehlt [254].

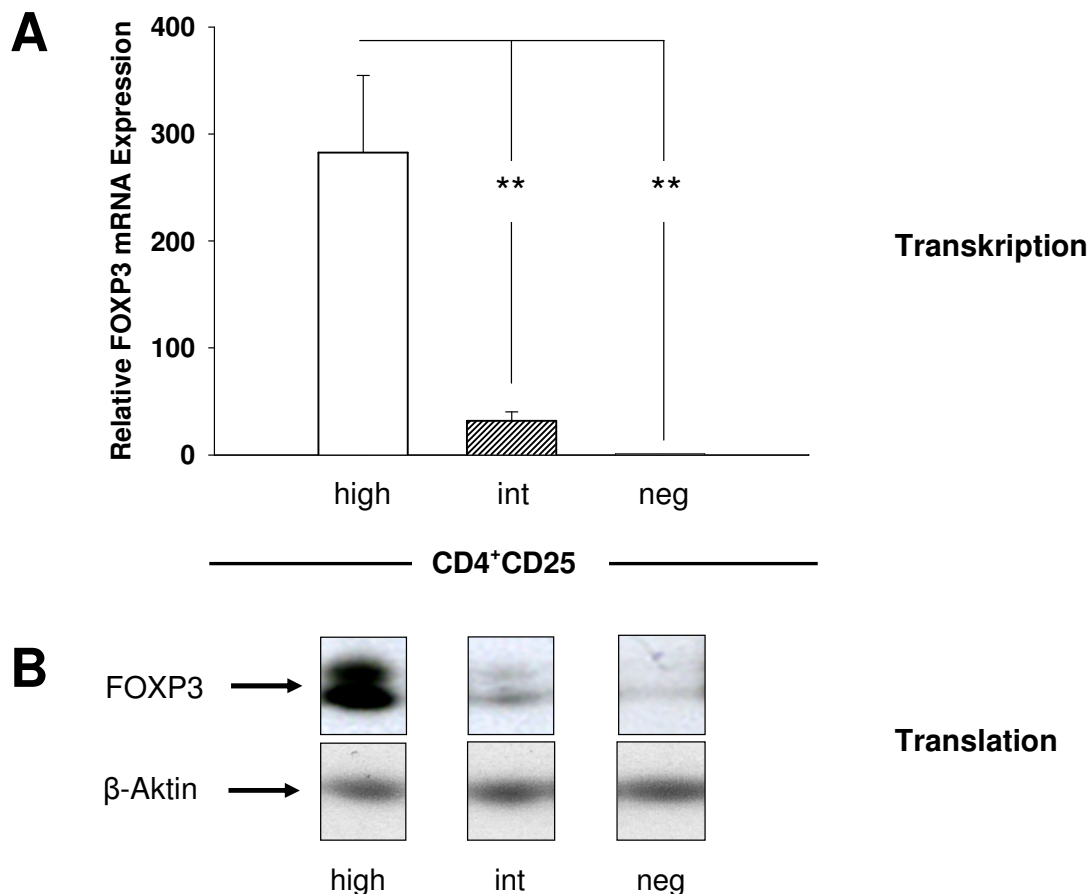


Abb. 4-15: FOXP3-Expression in sortierten CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen.

CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg} Zellpopulationen wurden aus Leukapheresaten durchflusszytometrisch sortiert. (**A**) Aus den jeweiligen Subpopulationen wurde zur Quantifizierung der FOXP3 mRNA Gesamt-RNA isoliert, diese durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und FOXP3 mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die relative mRNA-Expression gibt die Expression der FOXP3 mRNA normalisiert auf die Expression der 18S rRNA wieder und ist jeweils auf die Expression der CD4⁺CD25^{neg} bezogen. (**B**) Die FOXP3 Proteinexpression wurde mittels Western-Blot aus Zelllysaten der CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin mitgefärbt. Die *real-time* PCR-Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 6 unabhängigen Experimenten. Sterne kennzeichnen Unterschiede (*student's t*-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle (CD4⁺CD25^{neg}).

Unter der Annahme, dass FOXP3 ein linienspezifischer Marker für natürliche Treg-Zellen ist, zeigten diese Daten, dass Treg-Zellen in CD4⁺CD25^{high} T-Zellen hochgradig angereichert sind und sich diese deshalb als Ausgangspopulation für Treg-Kulturen eignen sollten.

4.2.1.1 Ermittlung eines geeigneten Haushaltsgens zur Quantifizierung der FOXP3 mRNA-Expression in expandierten Treg-Zellen

Eine wichtige Voraussetzung für die klinische Anwendung *in vitro* expandierter humaner Treg-Zellen ist der Erhalt ihrer regulatorischen Eigenschaften während der Expansion. Um dies zu überprüfen, wurde im Folgenden die FOXP3-Expression der CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen vor und nach Expansion untersucht.

Für die Quantifizierung der mRNA-Expressionslevel eines Ziel-Gens in unterschiedlichen Zellen ist eine Normalisierung der *real-time* PCR-Daten von enormer Bedeutung [255]. Neben der Normalisierung auf die Zellzahl und den Gesamt-RNA-Gehalt der Zellen wird in der Regel zusätzlich die Expression von internen Kontrollen, so genannten Haushaltsgenen, bestimmt. Haushaltsgene sind Gene, die unabhängig vom Zelltyp und äußeren Einflüssen in jeder Zelle stabil exprimiert werden. Typische Haushaltsgene sind für den Erhalt der Zellfunktionen wichtig, wie etwa das β -Aktin, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder β -2-Mikroglobulin. Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung eines Haushaltsgens ist, dass seine Expression unter den gegebenen experimentellen Bedingungen möglichst stabil bleibt. In einer murinen Fibroblastenzelllinie wurde der Effekt der Stimulation mit Serumzytokinen auf die Expression verschiedener Haushaltsgene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation einen starken Anstieg der β -Aktin und GAPDH mRNA Level bewirkte, während sich die Expression der 18S rRNA nur marginal veränderte [256].

Um den Effekt der polyklonalen Stimualtion über anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper in Kombination mit exogenem IL-2 auf das Expressionslevel verschiedener Haushaltsgene zu überprüfen, wurden die CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen für 0 (frisch sortiert), 4, 18, 48, 72 und 96 Stunden mit TCE-beads und 300 U/ml IL-2 stimuliert. Die Expression von CD4, β -2-Mikroglobulin, β -Aktin, GAPDH mRNA sowie der 18S rRNA wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten mittels *real-time* PCR analysiert. Die Analyse ergab, dass die 18S rRNA unter diesen Stimulationsbedingungen zu jedem untersuchten Zeitpunkt in allen Subpopulationen am stabilsten exprimiert wurde, während die anderen Haushaltsgene stark induziert wurden. So überstieg die GAPDH mRNA-Expression in CD4⁺CD25^{neg} Zellen 48h nach Stimulierung den Level der frisch sortierten Zellen um das 21,5-fache (**Abb. 4-16A**). Des Weiteren wurde die GAPDH mRNA auch zwischen den einzelnen Subpopulationen unterschiedlich exprimiert, da sich nach 18h das mRNA-Level CD4⁺CD25^{neg} Zellen gegenüber dem der CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen um das 2,3-fache erhöhte. Im Gegensatz dazu zeigte die Expression der 18S rRNA weder innerhalb noch zwischen den CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen starke Varianzen und veränderte sich maximal um den Faktor 2 (**Abb. 4-16B**).

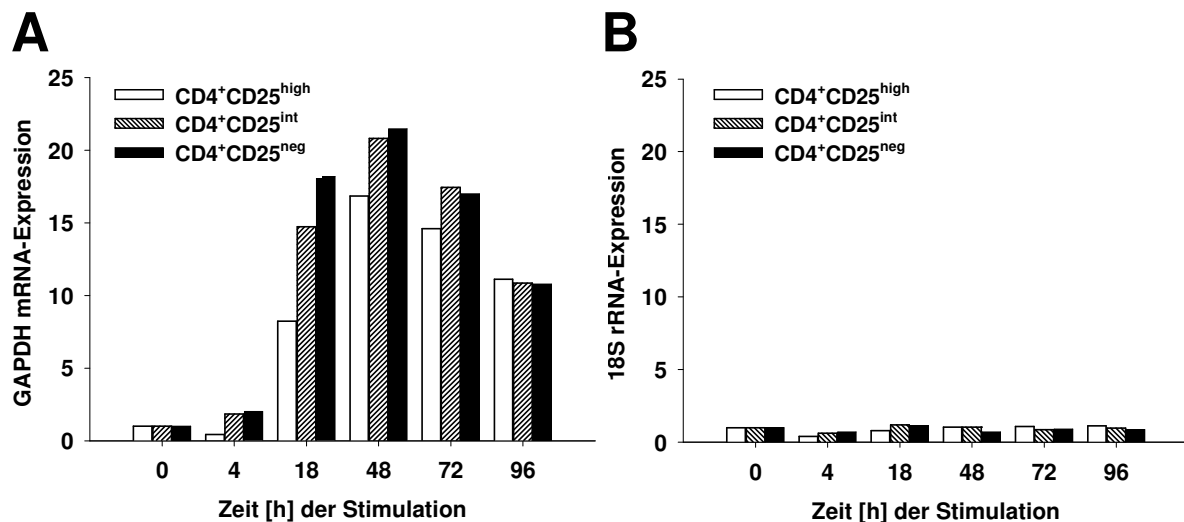


Abb. 4-16: Expression der Haushaltsgene GAPDH und 18S rRNA in sortierten CD4⁺ T-Zellsubpopulationen nach Aktivierung.

CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg} Zellpopulationen wurden aus Leukapheresaten durchflusszytometrisch sortiert und für 0, 4, 18, 48, 72 und 96h mit TCE-*beads* polyklonal stimuliert. Aus den Zellpopulationen wurde zu den gegebenen Zeitpunkten Gesamt-RNA isoliert, diese durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die absoluten Expressionslevel von GAPDH (**A**) bzw. 18S (**B**) zu den angegebenen Zeitpunkten wurden auf den Ausgangswert (0) der jeweiligen Zellpopulation bezogen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Nachdem die Expression der 18S rRNA nach polyklonaler Stimulation der CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen am wenigsten variierte, wurde in Nachfolgeexperimenten das 18S rRNA-Level zur Normalisierung der *real-time* PCR-Daten verwendet.

4.2.1.2 FOXP3-Expression in humanen CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen vor und nach Expansion

Die nach CD25-Expressionslevel sortierten CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen wurden mit Hilfe zweier verschiedener Systeme polyklonal expandiert (s. 3.2.1.10). In einem System (L-Zellkultur) dienten CD32-transfizierte murine Fibroblasten (CD32⁺ L-Zellen) als Stimulatoren, die anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper auf ihrer Oberfläche präsentieren. Das zweite System (TCE-Kultur, *T Cell Expander*) bestand aus artifiziellen APCs (TCE-*beads*), die anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen. Um den anergen Zustand der humanen natürlichen Treg-Zellen überwinden zu können, wurde dem Kulturmedium zusätzlich 300 U/ml humanes IL-2 zugesetzt.

Um zu untersuchen, inwieweit sich die FOXP3-Expression im Kulturverlauf der CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen ändert, wurde das mRNA-Expressionslevel von sieben verschiedenen TCE-Kulturen und sechs verschiedenen L-Zellkulturen analysiert. Auf Transkriptionsebene zeigten die CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen sowohl in der TCE-Kultur (**Abb. 4-17A**) als auch in der L-Zellkultur (**Abb. 4-17B**) gegenüber CD4⁺CD25^{neg} und CD4⁺CD25^{int} T-Zellen

zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine stark erhöhte Expression der FOXP3 mRNA. Das FOXP3 mRNA-Level der $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen stieg während des frühen Kulturverlaufs an, wobei sich die mRNA Expression in der TCE-Kultur an Tag 14 um das 1,7-fache und in der L-Zellkultur an Tag 17 um das 2,6-fache im Vergleich zu frisch isolierten Treg-Zellen (Tag 0) erhöhte. 21 Tage nach Expansion nahm die FOXP3 mRNA-Expression der $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen in beiden Kultursystemen ab. Im Vergleich zu frisch sortierten Treg-Zellen wurde der Expressionslevel im Falle der TCE-Kultur jedoch beibehalten und in der L-Zellkultur noch um das 1,7-fache überstiegen. Die Expansion führte auch bei $CD4^+CD25^{neg}$ und $CD4^+CD25^{int}$ T-Zellen zu einer Zunahme der FOXP3 mRNA-Level in beiden Kultursystemen. Im Vergleich zu $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen lag er bei $CD4^+CD25^{int}$ T-Zellen an Tag 21/22 dennoch um 10,1-fach (L-Zellkultur) bzw. 4,1-fach (TCE-Kultur) niedriger. Auch der FOXP3 mRNA-Transkriptionslevel der $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen lag an Tag 21/22 um den Faktor 9 (L-Zellkultur) bzw. 8,7 (TCE) signifikant niedriger als der der Treg-Zellen.

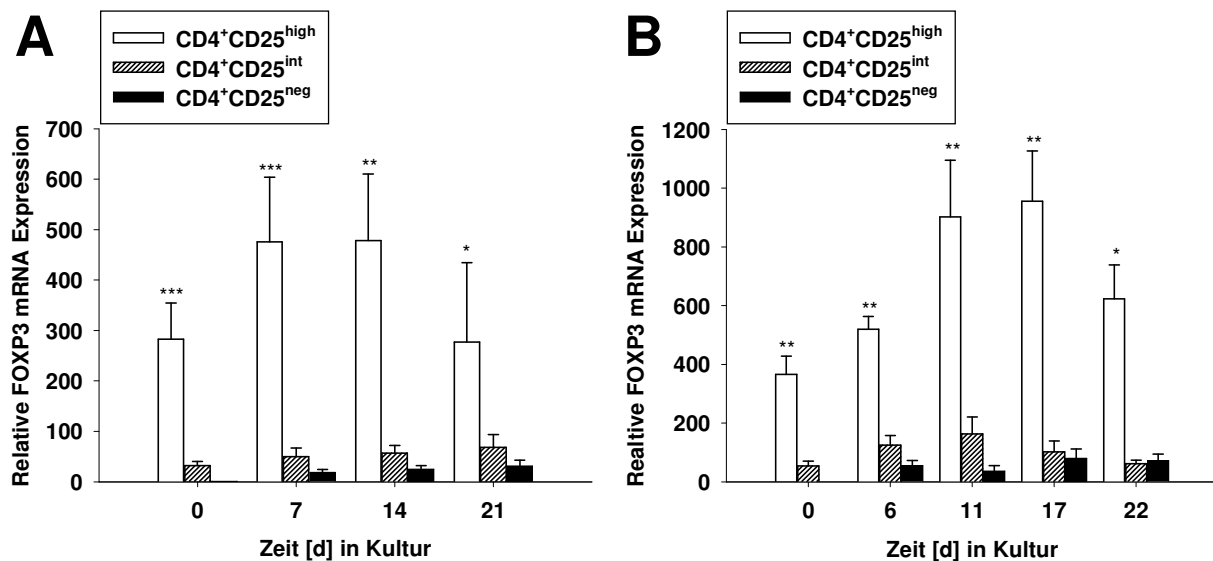


Abb. 4-17: FOXP3 mRNA-Expression *in vitro* expandierter humaner $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen.

$CD4^+CD25^{high}$, $CD4^+CD25^{int}$ sowie $CD4^+CD25^{neg}$ Zellpopulationen wurden aus Leukapheresaten durchflusszytometrisch sortiert und entweder mit anti-CD3/CD28-tragenden $CD32^+$ L-Zellen oder TCE-beads in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 expandiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus den T-Zell-Subpopulationen zur Quantifizierung der FOXP3 mRNA Gesamt-RNA isoliert, diese durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die relative mRNA-Expression gibt die Expression der FOXP3 mRNA normalisiert auf die Expression der 18S rRNA wieder und ist jeweils auf die Expression der $CD4^+CD25^{neg}$ an Tag 0 bezogen. Relative FOXP3 mRNA-Expression in (A) TCE-Kulturen und (B) L-Zellkulturen. Die *real-time* PCR-Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 6 L-Zell- und 7 TCE-Kulturen. Sterne kennzeichnen Unterschiede (*student's t*-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle ($CD4^+CD25^{neg}$).

Das transkriptionelle Expressionsmuster von FOXP3 bestätigte sich auch auf Proteinebene. So konnte mittels Western-Blot-Analyse auch im Kulturverlauf eine deutlich stärkere FOXP3 Proteinexpression in $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen im Vergleich zu $CD4^+CD25^{int}$ bzw. $CD4^+CD25^{neg}$ Zellen detektiert werden (**Abb. 4-18**).

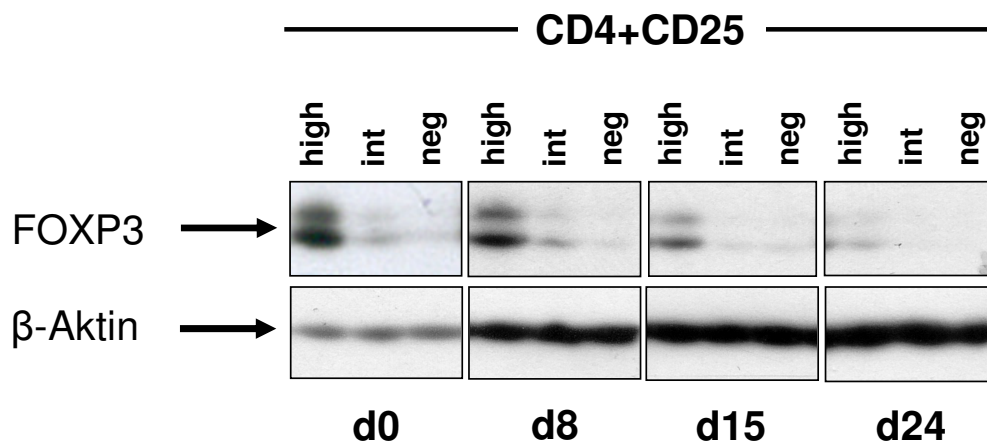


Abb. 4-18: FOXP3 Proteinexpression *in vitro* expandierter humaner $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen. $CD4^+CD25^{high}$, $CD4^+CD25^{int}$ sowie $CD4^+CD25^{neg}$ Zellpopulationen wurden aus Leukapheresaten durchflusszytometrisch sortiert und entweder mit anti-CD3/CD28-tragenden $CD32^+$ L-Zellen oder TCE-beads in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 expandiert. Die FOXP3 Proteinexpression wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aus Zelllysaten $CD4^+$ T-Zell-Subpopulationen bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin gefärbt.

4.2.1.3 FOXP3-Expression in humanen konventionellen T-Zellen nach Aktivierung

Wie der Kulturverlauf zeigte, steigt nach polyklonaler Aktivierung auch in konventionellen $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen die FOXP3 mRNA Expression an. In murinen konventionellen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen hingegen konnte bis dahin keine Hochregulation der FoxP3 mRNA-Expression nach Aktivierung festgestellt werden [104, 109]. Um abzuklären, ob die FOXP3 mRNA-Expression in humanen konventionellen T-Zellen nach Aktivierung tatsächlich induziert wird, wurden die FOXP3 mRNA-Level von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach polyklonaler Stimulation analysiert.

Dazu wurden $CD4^+CD25^{neg}$ und $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und mit TCE-beads für 4, 18, 48, 72 und 96 Stunden in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 stimuliert. Wie sich in der Kultur schon angedeutet hatte, nahm auch bei der Stimulation über 96 Stunden in $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen das Expressionslevel der FOXP3 mRNA mit der Aktivierung der Zellen kontinuierlich zu (**Abb. 4-19A**). So stieg die mRNA-Expression im Vergleich zu unstimulierten frisch isolierten $CD4^+CD25^{neg}$ Zellen schon nach 4 Stunden um das 4-fache und nach 96 Stunden um das 8,5-fache an. Ebenso konnte in $CD8^+$ T-Zellen nach Aktivierung eine Zunahme der FOXP3 mRNA-Expression nachgewiesen werden (**Abb. 4-**

19B). Der FOXP3 mRNA-Level stieg im Zeitverlauf kontinuierlich an und erreichte nach 72 Stunden ein Maximum, bei dem es die Expression frisch isolierter Zellen um das 70-fache übertraf. Als Positivkontrolle wurde die FOXP3 mRNA-Expression frisch sortierter $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen bestimmt. Trotz der Zunahme der FOXP3 mRNA-Expression nach Aktivierung konventioneller T-Zellen lag das Expressionslevel jedoch noch deutlich unter dem der $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen.

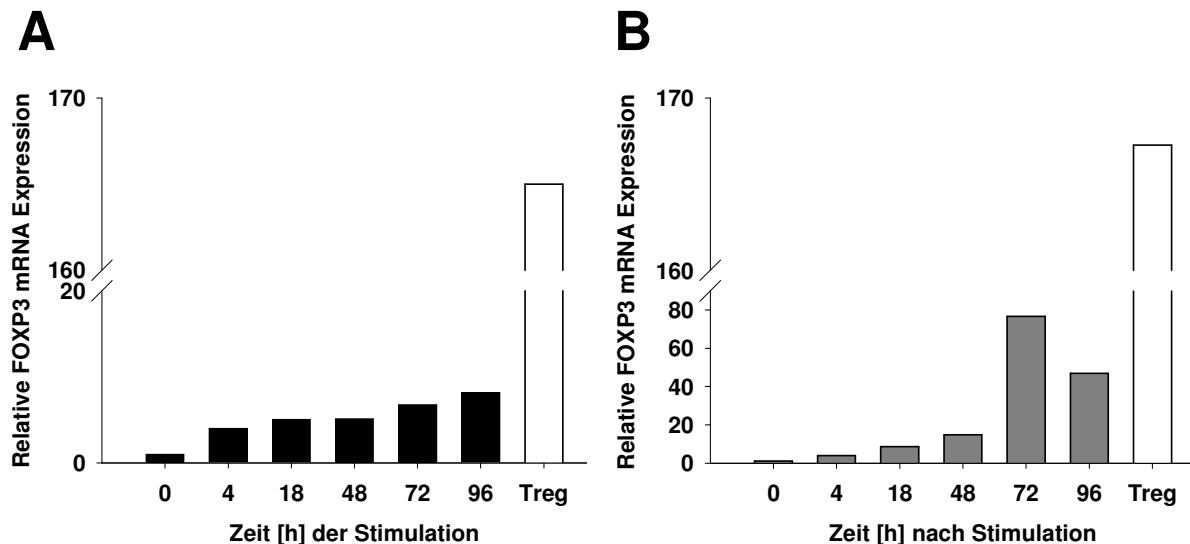


Abb. 4-19: FOXP3 mRNA-Expression *in vitro* aktivierter humaner konventioneller $CD4^+CD25^{neg}$ und $CD8^+$ T-Zellen.

$CD4^+CD25^{neg}$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden aus Leukapheresaten durchflusszytometrisch sortiert und mit TCE-beads in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 für 4, 18, 48, 72 und 96 h stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus den T-Zellpopulationen zur Quantifizierung der FOXP3 mRNA Gesamt-RNA isoliert, diese durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die relative mRNA Expression gibt die Expression der FOXP3 mRNA normalisiert auf die Expression der 18S rRNA wieder und ist jeweils auf die Expression der (A) $CD4^+CD25^{neg}$ bzw. (B) $CD8^+$ Zellen zum Zeitpunkt 0 bezogen. Relative FOXP3 mRNA-Expression in (A) $CD4^+CD25^{neg}$ und (B) $CD8^+$ T-Zellen nach Aktivierung. Als Positivkontrolle diente die FOXP3 mRNA-Expression frisch sortierter $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.2.2 Suppressive Aktivität *in vitro* expandierter $CD4^+ CD25^{high}$ Treg-Zellen

Neben der phänotypischen und molekularen Analyse *in vitro* expandierter Treg-Zellen wurde auch ihre suppressive Aktivität im *in vitro* Suppressions-Assay überprüft. Dazu wurden $CD4^+$ Tkonv-Zellen aus PBMCs mittels MACS mit einer Reinheit von > 95 % aufgereinigt und mit autologen $CD2$ -depletierten PBMCs in Anwesenheit von anti- $CD3$ -Antikörpern polyklonal stimuliert. Um die suppressive Aktivität *in vitro* expandierter $CD4^+$ T-Zell-Subpopulationen zu überprüfen, wurden diese im Verhältnis Tkonv:Treg 4:1 eingesetzt. Zur Detektion der Proliferation wurden Tkonv-Zellen mit CFSE gefärbt und die durch Zellteilung resultierende Reduktion des Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt.

Vier Tage nach polyklonaler Stimulation proliferierten 90,3 % der konventionellen CD4⁺ T-Zellen des Kontrollansatzes (**Abb. 4-20**). Die Zugabe *in vitro* expandierter CD4⁺CD25^{neg} hatte wenig Einfluss auf die Proliferation (70 %), während die Zugabe expandierter CD4⁺CD25^{int} die Proliferation der Tkonv-Zellen tendenziell minimierte (53 %). Im Gegensatz dazu führte die Kokultur mit *in vitro* expandierten CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation von Tkonv-Zellen (29 %).

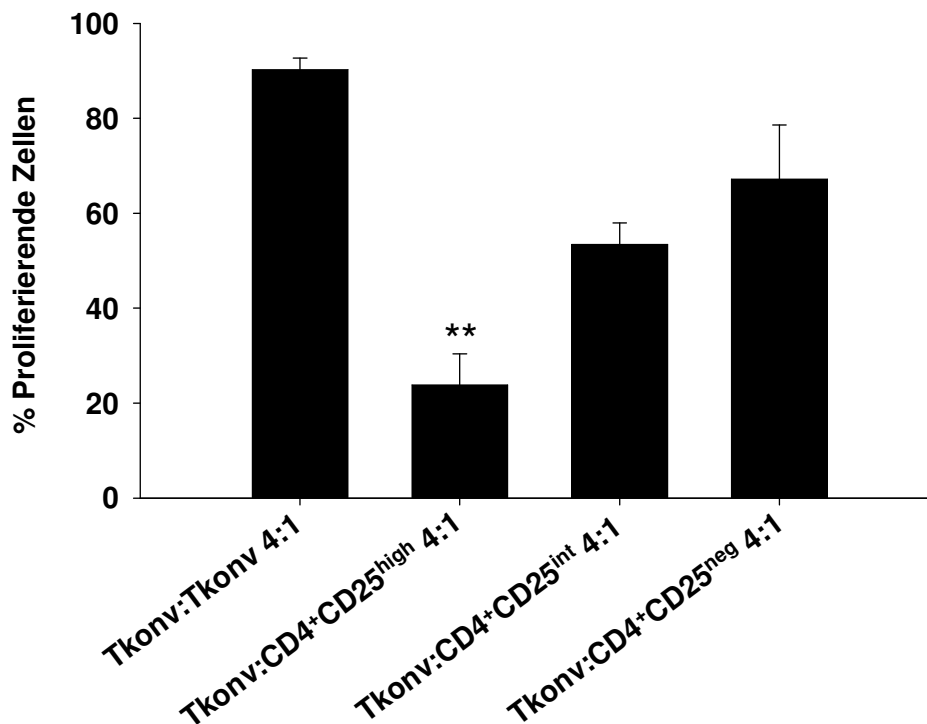


Abb. 4-20: Suppressive Aktivität expandierter humaner CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen *in vitro*.

CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} sowie CD4⁺CD25^{neg} Zellpopulationen wurden in der L-Zellkultur für 11 Tage expandiert und vor dem Suppressions-Assay in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 ohne Stimulation über CD3/CD28 für 4 Tage ruhiggestellt. CD4⁺ Tkonv-Zellen wurden mittels MACS aus PBMCs isoliert, mit CFSE gefärbt und mit autologen CD2-depletierten PBMCs in Anwesenheit von anti-CD3-Antikörpern polyklonal stimuliert. Um eine Proliferation der Stimulatorzellen zu vermeiden, wurden diese mit 30 Gy bestrahlt. *In vitro* expandierte CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen wurden im Verhältnis 1:4 zu Tkonv-Zellen zugegeben. 4 Tage nach Stimulation wurden die Zellen geerntet, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle dienten Tkonv-Zellen + Tkonv-Zellen im Verhältnis 4:1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 9$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (*student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass FOXP3 präferentiell in CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen exprimiert wird und humane CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen auch nach Expansion ein hohes Expressionslevel für FOXP3 beibehalten. Die FOXP3-Expressionsstärke expandierter CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen korrelierte mit ihrer suppressiven Aktivität, wobei CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen die stärkste Suppression zeigten. Somit entsprechen CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen auch nach Expansion frisch isolierten Treg-Zellen in Phänotyp und Funktion, was für potentielle klinische Anwendungen expandierter Treg-Zellen von Bedeutung ist.

4.2.3 Charakterisierung naiver und antigenerfahrener CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen

Teile der nachfolgenden Ergebnisse wurden in folgendem Artikel publiziert

“Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T cell lines upon in vitro expansion”

Hoffmann P., Eder R., Boeld T.J., Doser K., Piseshka B., Andreesen R. & M. Edinger (2006), Blood, 108(13): p. 4260-7

Der Chemokinrezeptor 7 (CCR7) sowie das Zelladhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) ermöglichen das *homing* von T-Zellen in den Lymphknoten, das eine wichtige Voraussetzung für die protektive Wirkung von natürlichen Treg-Zellen in vielen Krankheitsmodellen ist [223, 252, 253]. **Abb. 4-20** zeigt die CCR7- und CD62L-Expression humaner CD4⁺CD25 T-Zell-Subpopulationen im Verlauf einer repräsentativen L-Zellkultur. Im Kulturverlauf verloren nach Expansion CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen die Koexpression der Lymphknoten-*homing*-Rezeptoren von Tag 0 (**Abb. 4-14C**), während die CD4⁺CD25^{high} Treg-Population bis Tag 11 die einheitliche Expression von CCR7 und CD62L beibehielt. So waren an Tag 6 nach Expansion 75,7 % Zellen der CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen CCR7⁺CD62L⁺, während nur noch 49,2 % der CD4⁺CD25^{int} und 42,4 % der CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen eine Koexpression dieser Moleküle zeigte. Erst am Tag 18 verloren auch CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen die CCR7-Expression, so dass nur noch 38,7 % der Zellen CCR7⁺CD62L⁺ waren, wohingegen zu diesem Zeitpunkt auf CD4⁺CD25^{int} bzw. CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen kaum noch CCR7 zu detektieren war. Ebenso nahm nach Expansion die CD62L-Expression vorwiegend in der CD4⁺CD25^{int} bzw. CD4⁺CD25^{neg} Subpopulation ab.

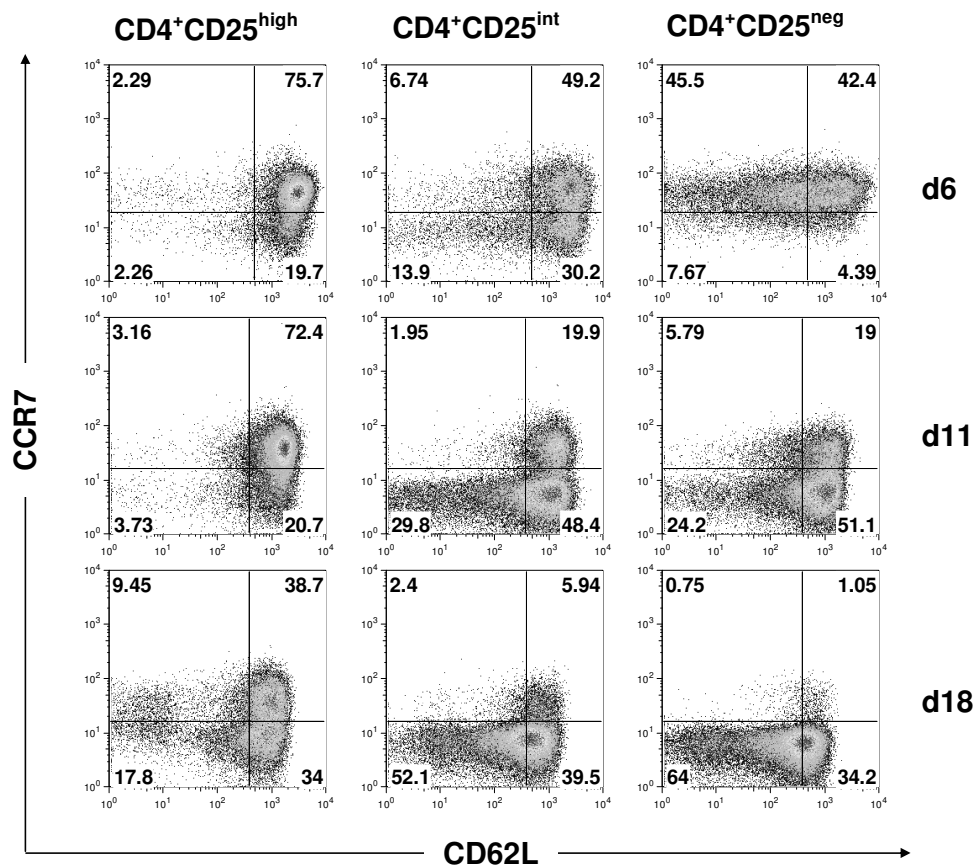


Abb. 4-21: Expression der Lymphknoten-homing-Rezeptoren CCR7 und CD62L auf *in vitro* expandierten humanen CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen.

CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} sowie CD4⁺CD25^{neg} Zellpopulationen wurden in der L-Zellkultur expandiert. 6, 11 und 18 Tage nach Expansion wurden die Zellen geerntet, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CCR7, CD62L, CD4 und CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist eine repräsentative Kultur.

Die Verfügbarkeit eines für die Durchflusszytometrie geeigneten monoklonalen Antikörpers gegen FOXP3 ermöglichte mittlerweile die Detektion des FOXP3 Proteins auf Einzelzell-ebene [257]. Eine Mehrfarben-Analyse *in vitro* expandierter CD4⁺CD25^{high} T-Zellen zeigte eine präferentielle FOXP3-Expression in CD62L⁺CCR7⁺ (high^{+/+}) im Vergleich zu CD62L⁺CCR7⁻ (high^{+/-}) oder CD62L⁻CCR7⁻ (high^{-/-}) Zellen der CD4⁺CD25^{high} Treg-Population, während in den entsprechenden Subpopulationen der CD4⁺CD25^{neg} T-Zell-Population (neg^{+/+} bzw. neg^{+/-} oder neg^{-/-}) kein FOXP3 zu detektieren war.

Um zu überprüfen, ob high^{+/+} Zellen eine reine Treg-Population darstellen, wurden high^{+/+}, high^{+/-}, neg^{+/+} und neg^{+/-} Zellen aus *in vitro* expandierten CD4⁺CD25^{high} bzw. CD4⁺CD25^{neg} Zellen durchflusszytometrisch sortiert und die FOXP3 mRNA-Expression analysiert. Die Analyse ergab eine präferentielle Expression der FOXP3 mRNA in der high^{+/+} Subpopulation (**Abb. 4-22A**), während das Expressionslevel der high^{+/-} Population um das 4,5-fache reduziert war. Im Gegensatz dazu zeigten weder Zellen der neg^{+/+} noch neg^{+/-} Population eine relevante FOXP3 mRNA-Expression. Auch nach einer weiteren 7-tägigen Expansion in

der TCE-Kultur blieb das FOXP3 mRNA-Level der high^{+/+} Treg-Subpopulation konstant und war im Vergleich zu allen anderen Subpopulationen deutlich erhöht (**Abb. 4-22B**). Die Isolierung CD62L⁺CCR7⁺CD4⁺CD25^{high} Zellen direkt aus PBMCs ergab jedoch nach Expansion keine phänotypisch und funktionell stabile Treg-Population.

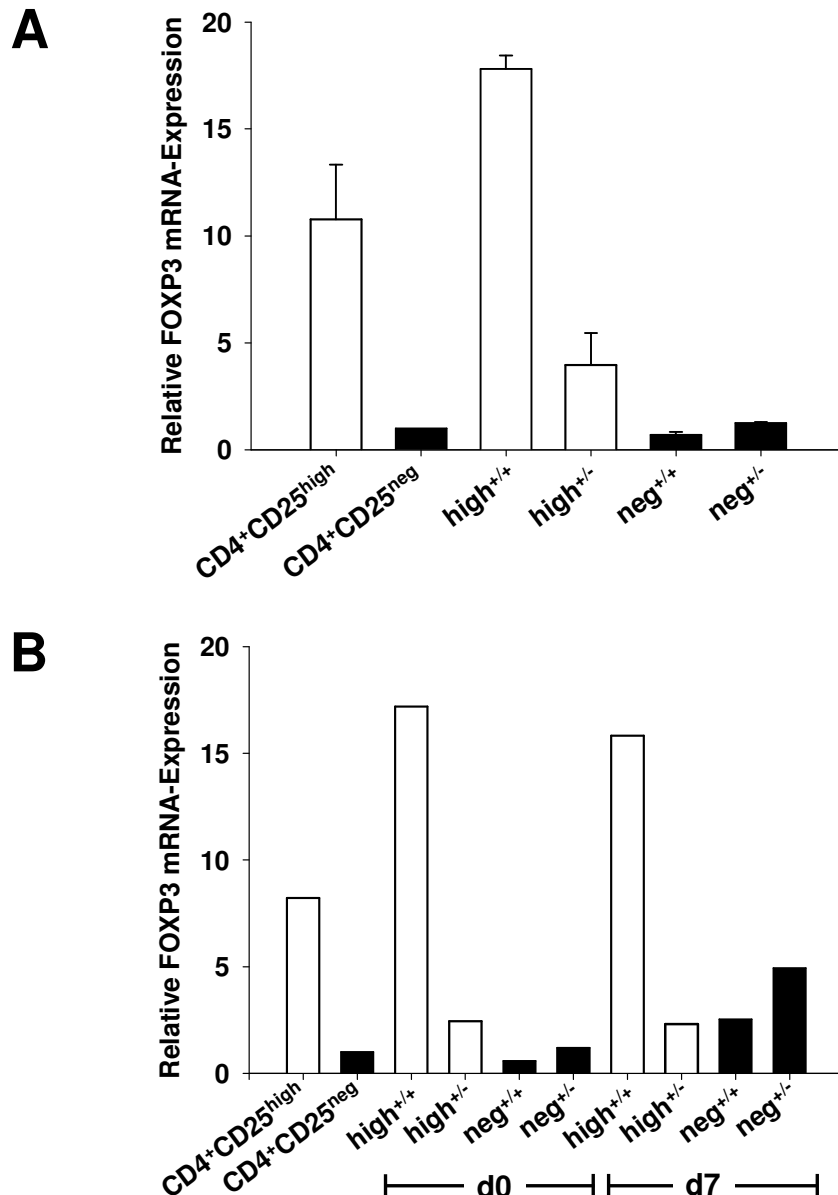


Abb. 4-22: FOXP3 mRNA Expression *in vitro* expandierter CD62L und CCR7 koexprimierender CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen vor und nach Expansion.

Nach 11-tägiger Expansion in der L-Zellkultur und Ruhigstellen in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 ohne Stimulation über CD3/CD28 für weitere 4 Tage wurden aus Kulturen der CD4⁺CD25^{high} bzw. CD4⁺CD25^{neg} T-Zellpopulation jeweils CD62L⁺CCR7⁺ (^{+/+}) oder CD62L⁺CCR7⁻ (^{+/-}) Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde zur Quantifizierung der FOXP3 mRNA Gesamt-RNA isoliert, diese durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die relative mRNA-Expression gibt die Expression der FOXP3 mRNA normalisiert auf die Expression der 18S rRNA wieder und ist jeweils auf die Expression der CD4⁺CD25^{neg} vor Zellsortierung bezogen. Relative FOXP3 mRNA-Expression (**A**) direkt nach Isolation und (**B**) nach 7-tägiger Expansion in der TCE-Kultur. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten (A) bzw. ein repräsentatives Experiment (B).

Die Koexpression von CCR7 und CD62L ist für den Phänotyp sowohl naiver T-Zellen als auch einer Subpopulation antigenerfahrener Gedächtnis-T-Zellen, so genannte *central memory* (CM) T-Zellen, charakteristisch [258]. Die beiden Populationen unterscheiden sich jedoch in der Expression des Leukozyten-Antigens CD45, da naive T-Zellen vorwiegend die Isoform CD45RA exprimieren, während von CM-T-Zellen die Isoform CD45RO exprimiert wird. Eine Analyse der $CD4^+CD25^{high}$ Population im PB gesunder Spender (im Alter von 22 bis 48 Jahren) ergab im Durchschnitt 42 % $CD45RA^+$ Zellen (**Abb.4-23A**). Durch Vergleich der Expression von CCR7 und CD62L in naiven $CD45RA^+CD4^+CD25^{high}$ (RA^+) und antigenerfahrenen $CD45RA^-CD4^+CD25^{high}$ (RA^-) Treg-Zellen konnte eine einheitliche Koexpression der Lymphknoten-*homing*-Rezeptoren in naiven Treg-Zellen nachgewiesen werden, während antigenerfahrene Treg-Zellen ein heterogenes Expressionsmuster aufwiesen (**Abb.4-23B**). In durchflusszytometrischen Analysen zeigten beide Treg-Subpopulationen eine homogene FOXP3-Expression, wobei RA^- Treg-Zellen eine leicht erhöhte Expression gegenüber RA^+ Treg-Zellen aufzeigten.

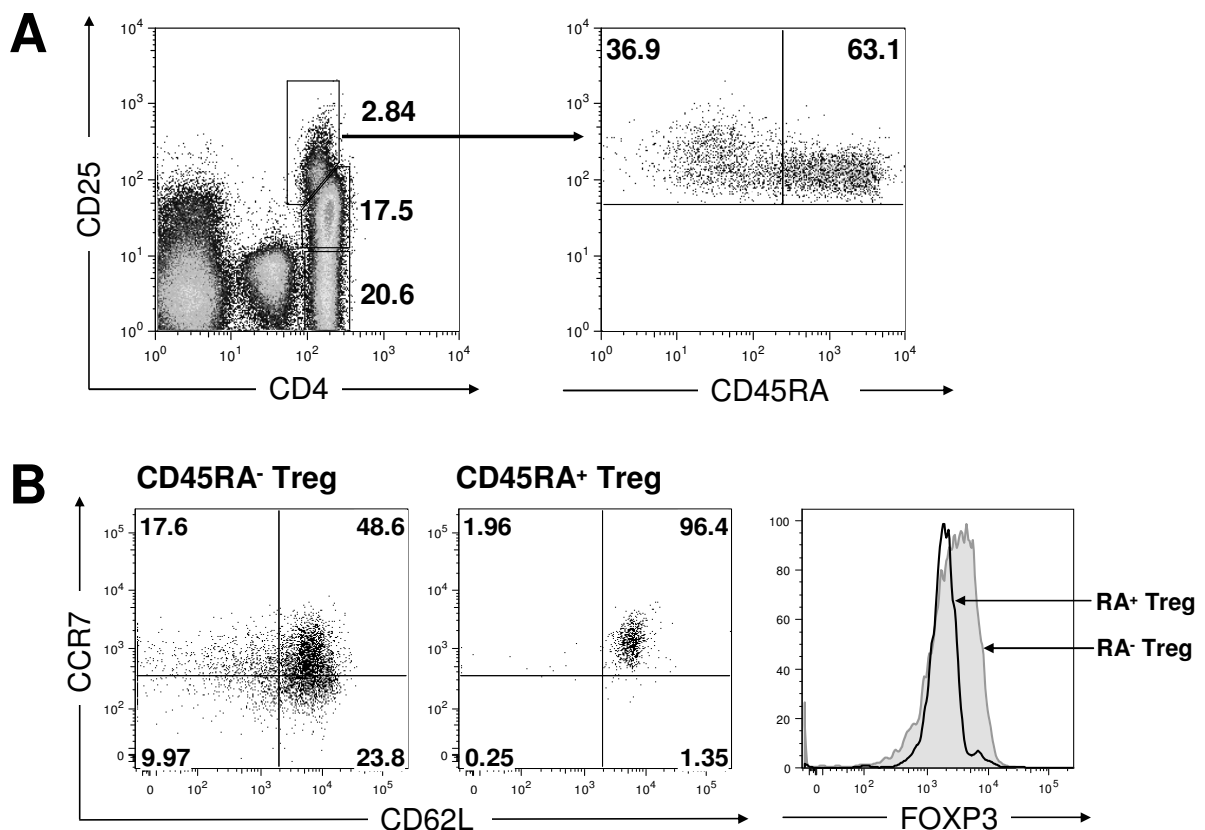


Abb. 4-23: Phänotyp naiver ($CD45RA^+$) und antigenerfahrener ($CD45RA^-$) $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen im PB adulter Spender.

Humane PBMCs wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern zunächst gegen CD4, CD25, CD45RA, CCR7 und CD62L gefärbt, anschließend zur intranukleären Färbung des FOXP3 Proteins fixiert, permeabilisiert, FOXP3-markiert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. (**A**) $CD45RA$ -Expression der $CD4^+CD25^{high}$ Population. (**B**) CCR7- und CD62L-Expression sowie intranukleäre FOXP3-Expression $CD45RA^+$ bzw. $CD45RA^-$ Treg-Zellen. Dargestellt ist eine repräsentative Analyse.

Um mögliche Unterschiede in Phänotyp und Funktion naiver und antigenerfahrener Treg-Zellen der $CD4^+CD25^{high}$ Population nach Expansion zu identifizieren, wurden RA^+ sowie RA^- Treg-Zellen aus Leukapheresaten durchflusszytometrisch sortiert und *in vitro* expandiert. Die phänotypische Analyse der Lymphknoten-*homing*-Rezeptoren ergab nach Expansion eine einheitliche Koexpression auf RA^+ Treg-Zellen (74 % an Tag 18, $n = 10$), während RA^- Treg-Zellen schon früh nach Expansion eine heterogene Koexpression zeigten, die im Zeitverlauf noch weiter abnahm (33 % an Tag 18; $n = 10$). Außerdem wiesen Analysen im Kulturverlauf eine stabile FOXP3-Expression in RA^+ Treg-Zellen sowohl auf mRNA-Ebene (**Abb.4-24A**) als auch auf Proteinebene (**Abb.4-24B**) nach. In Einklang mit der intranukleären Färbung des FOXP3 Proteins (**Abb. 4-23B**) war zum Zeitpunkt der Isolierung der FOXP3 mRNA-Level in RA^- Treg-Zellen im Vergleich zu RA^+ Treg-Zellen um den Faktor 1,9 erhöht. Im Verlauf der Expansion von RA^- Treg-Zellen reduzierte sich die FOXP3-Expression sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch auf Proteinebene. So war 21 Tage nach Expansion die mRNA-Expression um das 4,1-fache gegenüber RA^+ Treg-Zellen reduziert und das Protein konnte nur noch in 6 % der Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu exprimierten zu diesem Zeitpunkt 95 % der RA^+ Treg-Zellen das FOXP3 Protein. Damit wurde nachgewiesen, dass $RA^- CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen überraschenderweise ihre FOXP3-Expression im Kulturverlauf verlieren, während naive Treg-Zellen auch nach Expansion stabil bleiben. Die Gesamtpopulation der $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (bestehend aus den $CD45RA^+$ und $CD45RA^-$ Subpopulationen) behielt während der Expansion ein intermediäres FOXP3-Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene. Im Vergleich zu RA^+ Treg-Zellen war die FOXP3 mRNA-Expression der $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Population um das 2,1-fache erniedrigt und die Proteinexpression analog um das 1,8-fache. Wie erwartet, zeigten konventionelle $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen im Vergleich zu den Treg-Subpopulationen weder auf Transkriptions- noch auf Proteinebene eine relevante FOXP3-Expression.

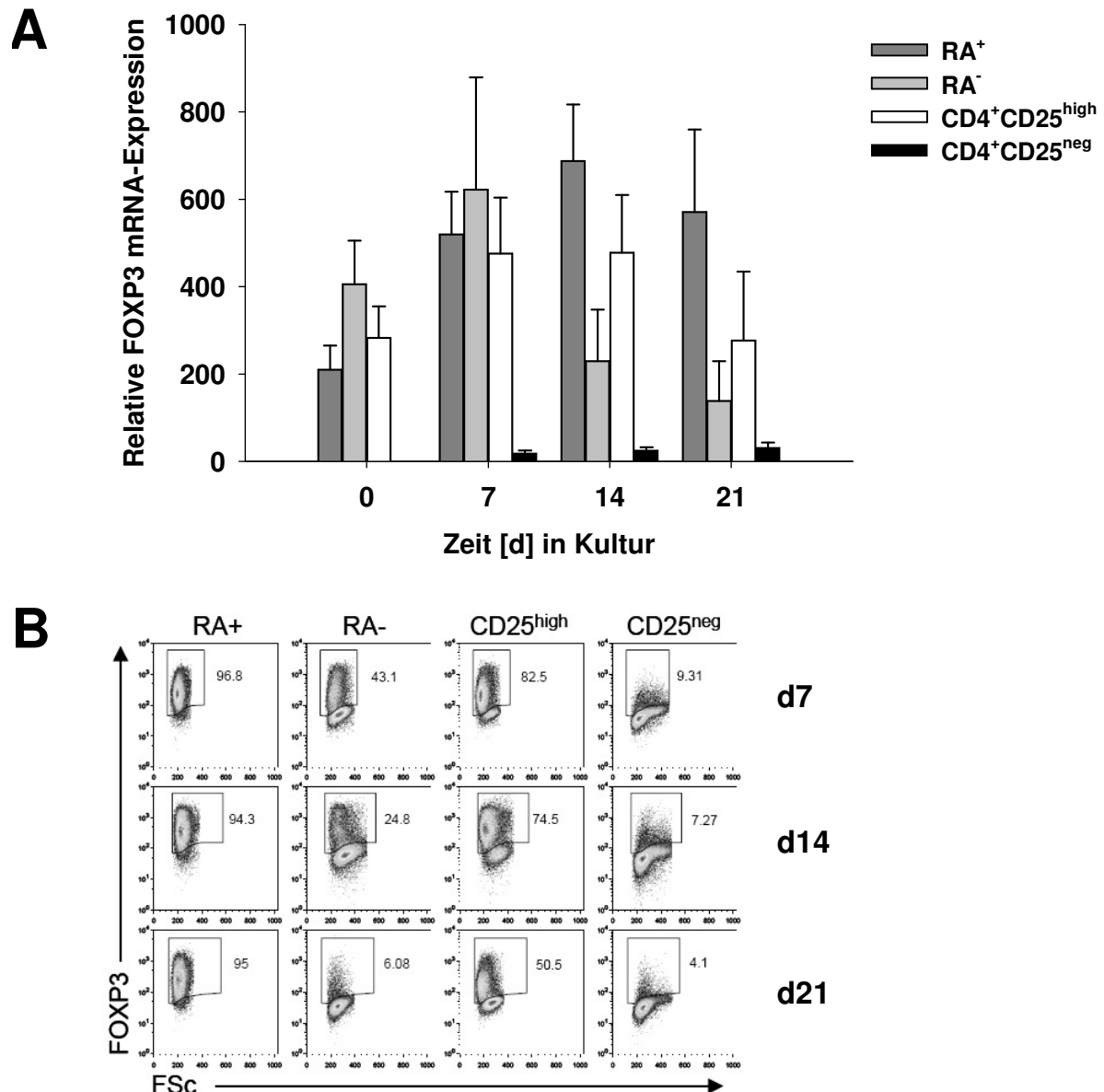


Abb. 4-24: FOXP3-Expression naiver (RA⁺) und antigenerfahrener (RA⁻) CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen im Verlauf der Expansion.

CD4⁺CD25^{high} T-Zellen sowie CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Subpopulationen von CD4⁺CD25^{high} T-Zellen und CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen wurden aus Leukapheresaten durchflusszytometrisch sortiert und mit TCE-beads in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 expandiert. **(A)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde zur Quantifizierung der FOXP3 mRNA Gesamt-RNA isoliert, diese durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt und mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die relative mRNA-Expression gibt die Expression der FOXP3 mRNA normalisiert auf die Expression der 18S rRNA wieder und ist jeweils auf die Expression der CD4⁺CD25^{neg} an Tag 0 bezogen. Die *real-time* PCR-Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM aus 6 TCE-Kulturen. **(B)** *In vitro* expandierte T-Zell-Subpopulationen wurden zu angegebenen Zeitpunkten mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern zunächst gegen CD4, CD25, CCR7 und CD62L gefärbt, anschließend zur intranukleären Färbung von FOXP3 fixiert, permeabilisiert, FOXP3-markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Um mögliche funktionelle Unterschiede der Treg-Subpopulationen zu überprüfen, wurde die suppressive Aktivität der Zellen in einem Suppressions-Assay getestet. *In vitro* expandierte RA⁺ Treg-Zellen zeigten eine starke Suppression, so dass sie die Proliferation der Tkonv-Zellen um 83 % ($90,3 \pm 2,4$ % proliferierende Tkonv-Zellen ohne Treg-Zell-Zugabe im

Vergleich zu $16,3 \pm 4,8$ % mit RA^+ Treg-Zellen) reduzierten (**Abb. 4-25**). Im Gegensatz dazu wiesen RA^- Treg-Zellen eine signifikant schwächere suppressive Aktivität auf. So war der Anteil proliferierender Tkonv Zellen mit $35,8 \pm 2,3$ % in Anwesenheit expandierter RA^- Treg-Zellen um das 2,2-fache erhöht im Vergleich zur Kokultur mit RA^+ Treg-Zellen. Die Proliferation von Tkonv-Zellen in Anwesenheit der $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Population war mit $23,9 \pm 6,5$ % proliferierenden Zellen niedriger als mit RA^- Treg-Zellen, jedoch höher als mit RA^+ Treg-Zellen. Expandierte $CD4^+CD25^{neg}$ Zellen zeigten erwartungsgemäß keine relevante Suppression.

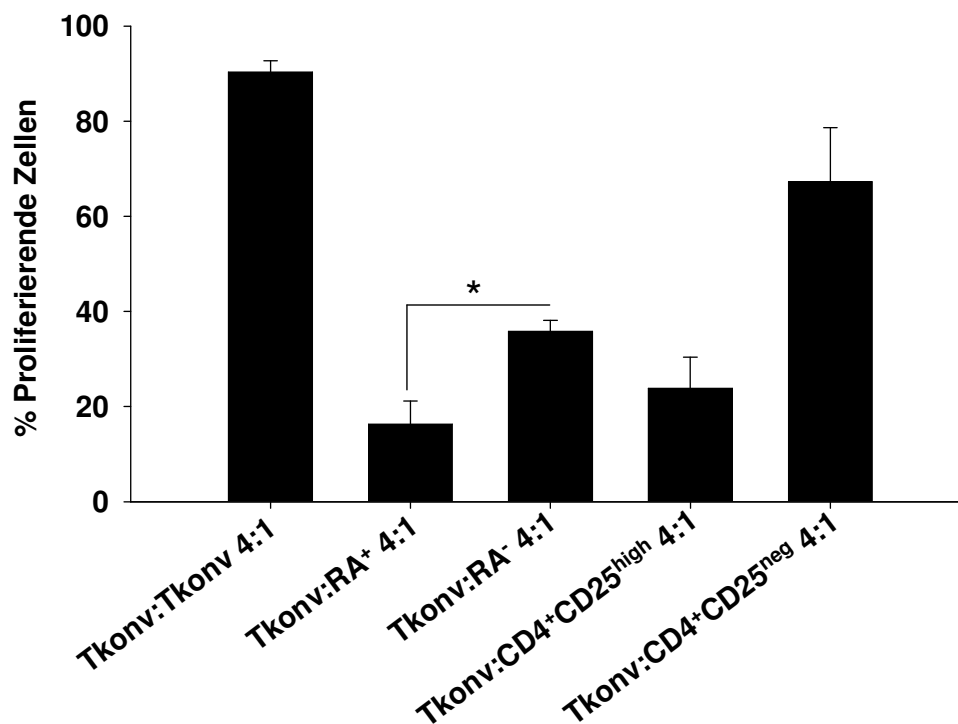


Abb. 4-25: Suppressiv Aktivität expandierter RA^+ bzw. RA^- Treg-Zellen *in vitro*.

RA^+ und RA^- Subpopulationen von $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen, $CD4^+CD25^{high}$ sowie $CD4^+CD25^{neg}$ Zellen wurden in der L-Zellkultur für 11 Tage expandiert und vor dem Suppressions-Assay in 300 U/ml IL-2 ohne Stimulation über CD3/CD28 für 4 Tage ruhiggestellt. $CD4^+$ Tkonv-Zellen wurden mittels MACS aus PBMCs isoliert, mit CFSE gefärbt und mit autologen CD2-depletierten PBMCs in Anwesenheit von anti-CD3-Antikörpern polykonal stimuliert. Um eine Proliferation der Stimulatorzellen zu vermeiden, wurden diese mit 30 Gy bestrahlt. *In vitro* expandierte Zellen wurden im Verhältnis 1:4 zu Tkonv-Zellen zugegeben. 4 Tage nach Stimulation wurden die Zellen geerntet, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt und die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt. Als Positivkontrolle dienten Tkonv-Zellen + Tkonv-Zellen im Verhältnis 4:1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 9$). Sterne kennzeichnen die Unterschiede (*student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$.

Diese Daten zeigten, dass nur naive, nicht aber antigenerfahrene natürliche Treg-Zellen des PB adulter Spender nach Expansion zu einer phänotypisch und funktionell stabilen Treg-Zelllinie führen. Daher scheint die Isolierung von RA^+ Treg-Zellen eine effektivere und sicherere Strategie darzustellen, um Treg-Zellprodukte für klinische Anwendungen zu generieren.

4.3 Mausmodell der xenogenen GvHD

Die Analyse der suppressiven Wirkung humaner natürlicher Treg-Zellen und der zugrunde liegenden Mechanismen ist bislang auf *in vitro* Untersuchungssysteme beschränkt. Eine detaillierte Untersuchung dieser Zellen in komplexen *in vivo* Modellsystemen wäre zur Erforschung der Biologie und Funktion natürlicher Treg-Zellen hilfreich. In den letzten Jahren haben sich immundefiziente Mäuse für klinische Fragestellungen zunehmend als geeignet erwiesen, da in ihnen ein Engraftment xenogener Transplantate möglich ist [233]. Van Rijn und Kollegen beschrieben ein xenogenes Transplantationsmodell, in welchem der Transfer humaner PBMCs in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse zur Entwicklung einer xenogenen Erkrankung führte, die der GvHD des Menschen ähnlich sein soll [234]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob das Modell geeignet ist die Rolle humaner Treg-Zellen in der GvHD aufzuklären.

4.3.1 Charakterisierung von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse besitzen aufgrund der Defizienz des *rag2*-Gens (*recombination activating gene*, RAG), dessen Enzym als Bestandteil der V(D)J-Rekombinase die Umlagerung und Rekombination von Immunglobulin- und TCR-Genen katalysiert, keine reifen B- und T-Zellen. Die zusätzliche Defizienz der gemeinsamen γ-Kette (*common γ-chain*, γc) der Interleukin-Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 verhindert darüber hinaus die Entwicklung funktionstüchtiger NK-Zellen. Gegenüber *scid*-Mäusen^e oder NOD/*scid*-Mäusen^f haben RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse entscheidende Vorteile, da sie weniger strahlensensibel sind, auch im fortgeschrittenen Alter nicht zur spontanen Bildung von B- und T-Zellen neigen und weniger Tumoren entwickeln [259]. Der Verlust funktionstüchtiger NK-Zellen in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen fördert zudem das Engraftment humaner Zellen.

Um den Phänotyp der RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse zu überprüfen, wurde ihr PB hinsichtlich der Expression von CD19 (B-Zellen), CD3 (T-Zellen) sowie CD49b bzw. DX-5 (NK-Zellen) analysiert. Als Positivkontrolle diente dabei das PB von wt BALB/c-Mäusen. Im PB der RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse konnten weder T- und B-Zellen, noch NK-Zellen oder NKT-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 4-26**), wodurch der genetische *knock-out* auch im Phänotyp bestätigt wurde. Der Großteil der Zellen des PB entstammte der Myelopoese mit durchschnittlich 20 ± 2 % CD11b⁺Gr-1⁻ Monozyten sowie 76 ± 2,3 % CD11b⁺Gr-1⁺ Granulozyten (*n* = 5).

^e *scid*-Mäuse weisen eine Mutation im *prkd*-Gen, das für eine DNA-abhängige Proteinkinase kodiert, auf. Als Teil der V(D)J-Rekombinase erfüllt sie eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von T- und B-Zellen. *scid*-Mäuse besitzen daher keine reifen B- und T-Lymphozyten.

^f sind eine Kreuzung aus *scid*- und NOD(*non-obese diabetic*)-Mäusen. NOD-Mäuse haben Defekte im Komplementsystem sowie in der Funktion von NK-Zellen und Makrophagen.

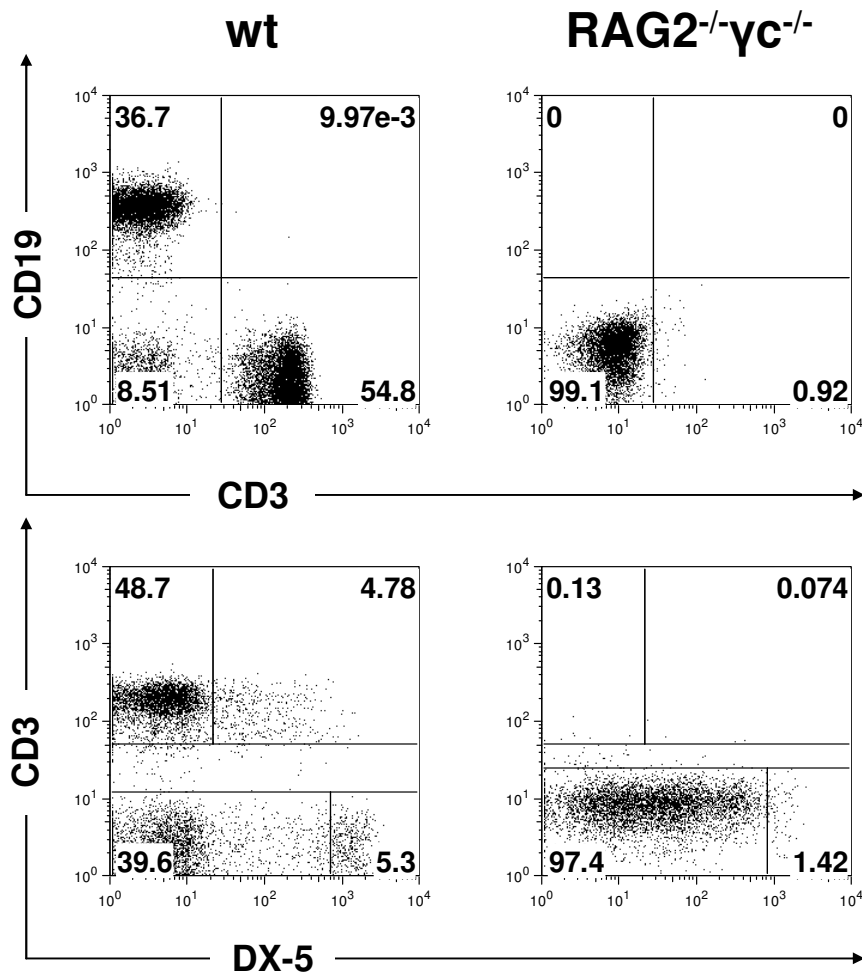


Abb. 4-26: Phänotyp von RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen.

Um den Phänotyp von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen zu bestimmen wurde das PB nach Erythrozyten-Lyse mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD3, CD19 und DX-5 (NK-Zellen) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle diente PB von wt BALB/c-Mäusen.

Die Analyse der hämatopoetischen Zellpopulationen der Milz und des KM ergab ein ähnliches Bild, da lediglich Granulozyten und Monozyten, jedoch keine B-, T- und NK-Zellen detektiert wurden. Sowohl KM als auch Milz enthielten außer CD45⁺ leukozytären Zellen jedoch auch eine deutliche Population von Zellen, die kein mCD45 aufwiesen (**Abb. 4-27A**). Dabei handelte es sich um lyseresistente erythroide Vorläuferzellen (*murine erythroid precursor*, MEP), die den Erythrozytenmarker mTER-119 exprimierten. Die Analyse von Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbten Gewebeschnitten des KM zeigte ein im Vergleich zu wt Mäusen hyperzelluläres Mark mit einer Zellularität von 95 % und lediglich vereinzelt Adipozyten (**Abb. 4-27B**). Darüber hinaus zeigten RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse eine ausgeprägte extramedulläre Blutbildung in der Milz, in der erythropoetische und myeloopoetische Zellen verschiedener Reifungsstadien sowie zahlreiche Megakaryozyten zu finden waren (**Abb. 4-27B**).

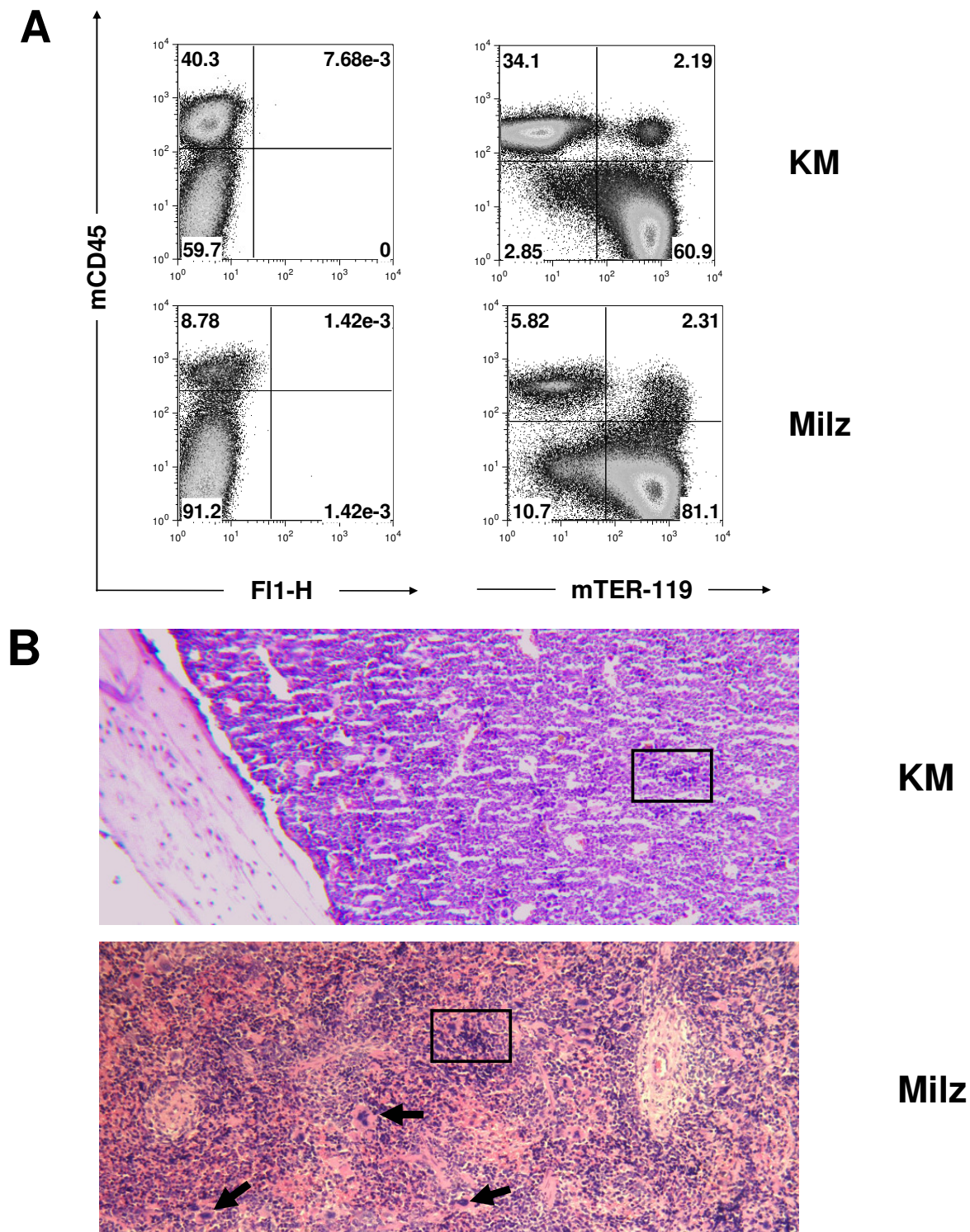


Abb. 4-27: Hämatopoese in KM und Milz von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen.

Milz- und Knochenmarkszellsuspensionen wurden nach Erythrozyten-Lyse mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD3, CD19, DX-5 (NK-Zellen), mCD45 und mTER-119 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Expression von mCD45 und mTER-119 in Milz und KM. **(B)** Paraffinschnitte von Milz und KM wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Aufnahmen entstanden bei 63-facher (KM) bzw. 100-facher (Milz) Vergrößerung. Die Pfeile markieren Megakaryozyten und Quadrate markieren Erythropoesenester.

4.3.2 Xenogenes Transplantationsmodell

4.3.2.1 Analyse der xGvHD-induzierenden Zellen

Van Rijn und Kollegen beschrieben, dass der intravenöse Transfer humaner (h) PBMCs zum Engraftment der Zellen in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen führt und die Tiere nach ca. 30 Tagen an einer xenogenen GvHD (xGvHD) versterben. Da im allogenen Mausmodell eine letale GvHD durch den alleinigen Transfer von Spender-T-Zellen induziert werden kann (s. 4.1), wurde zunächst untersucht, ob der Transfer isolierter Tkonv-Zellen ausreicht, um eine xGvHD hervorzurufen oder ob dazu akzessorische Zellen der PBMCs benötigt werden. Hierfür wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe der immunomagnetischen Zellseparation (MACS) aus hPBMCs mit einer Reinheit von > 95 % isoliert. Subletal bestrahlte RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse (3,5 Gy) wurden dann wie folgt transplantiert: Eine Behandlungsgruppe erhielt 30 x 10⁶ Gesamt-PBMCs inklusive 18 x 10⁶ T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺ im Verhältnis 2:1 [Gesamt-PBMC]), eine weitere erhielt nur 18 x 10⁶ T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺ im Verhältnis 2:1 [Tkonv]) und Tiere der dritten Behandlungsgruppe erhielten lediglich 12 x 10⁶ TZD PBMCs. Tiere, die mit TZD PBMCs transplantiert wurden, dienten als Negativkontrolle, da ohne T-Zelltransfer keine GvHD zu erwarten war.

Zur Beurteilung des Engraftments humaner Zellen wurden wöchentlich Chimärismusanalysen durchgeführt. Wie in **Abb. 4-28** dargestellt, entwickelten Tiere, die Gesamt-PBMCs erhielten, schon 14 Tage nach Transplantation einen hohen Spender-Chimärismus (80 ± 6,5 %). In Tieren die nur Tkonv-Zellen erhalten hatten, stieg der Anteil der hCD45⁺ Zellen im PB an Tag 14 auf 30 ± 5,8 % an. Während der Chimärismus in der Gruppe mit Gesamt-PBMCs auch 21 Tage nach Transplantation konstant erhöht blieb, nahm er in Tieren die nur Tkonv-Zellen erhalten hatten kontinuierlich ab und betrug an Tag 37 lediglich 5,3 ± 3,9 %. In Tieren die nur TZD PBMCs erhalten hatten konnten während des Beobachtungszeitraumes keine hCD45⁺ Zellen im PB detektiert werden.

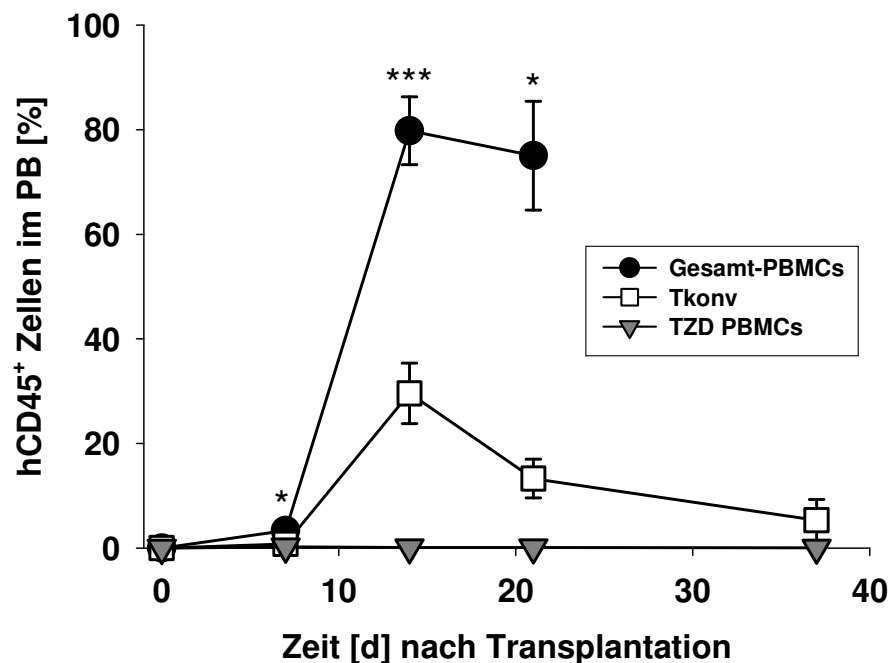


Abb. 4-28: Chimärismusanalyse nach xenogener Transplantation.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 30×10^6 Gesamt-PBMCs, 18×10^6 Tkonv-Zellen oder 12×10^6 TZD PBMCs xenogen transplantiert. 7, 14, 21 und 37 Tage nach Transplantation wurde das PB nach Erythrozyten-Lyse mit Fluorochrom-konjugierten Antikörper gegen das spenderspezifische hCD45 in Kombination mit mCD45, hCD4 und hCD8 gefärbt und die Frequenz humaner Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten ($n = 5-8$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (*student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle (TZD PBMCs).

Mit steigendem Anteil der hCD45⁺ Zellen im PB traten Symptome einer xenogenen Erkrankung auf. Hierzu gehörten rapider Gewichtsverlust, Kyphose, struppiges Fell, verminderte Aktivität, Mobilitätsstörungen und eine im Vergleich zu naiven Mäusen stark erhöhte Atemfrequenz (Tachypnoe). Tiere, die Gesamt-PBMCs erhalten hatten verloren ab Tag 14 nach Transplantation kontinuierlich Gewicht (**Abb. 4-29A**), entwickelten sehr starke Anzeichen der xenogenen Erkrankung (**Abb. 4-29B**) und verstarben innerhalb von 28 Tagen an den Folgen der Erkrankung (**Abb. 4-29C**). Im Gegensatz dazu entwickelten Mäuse, die nur Tkonv-Zellen erhalten hatten, deutlich mildere Anzeichen der Erkrankung, verloren weniger stark an Gewicht und 57 % der Mäuse überlebten den Beobachtungszeitraum. Erwartungsgemäß behielten Tiere, die mit TZD PBMCs transplantiert wurden, ein konstantes Körpergewicht, entwickelten außer einem leicht struppigen Fell nach Bestrahlung keinerlei Anzeichen einer Erkrankung und überlebten den Beobachtungszeitraum zu 100 %.

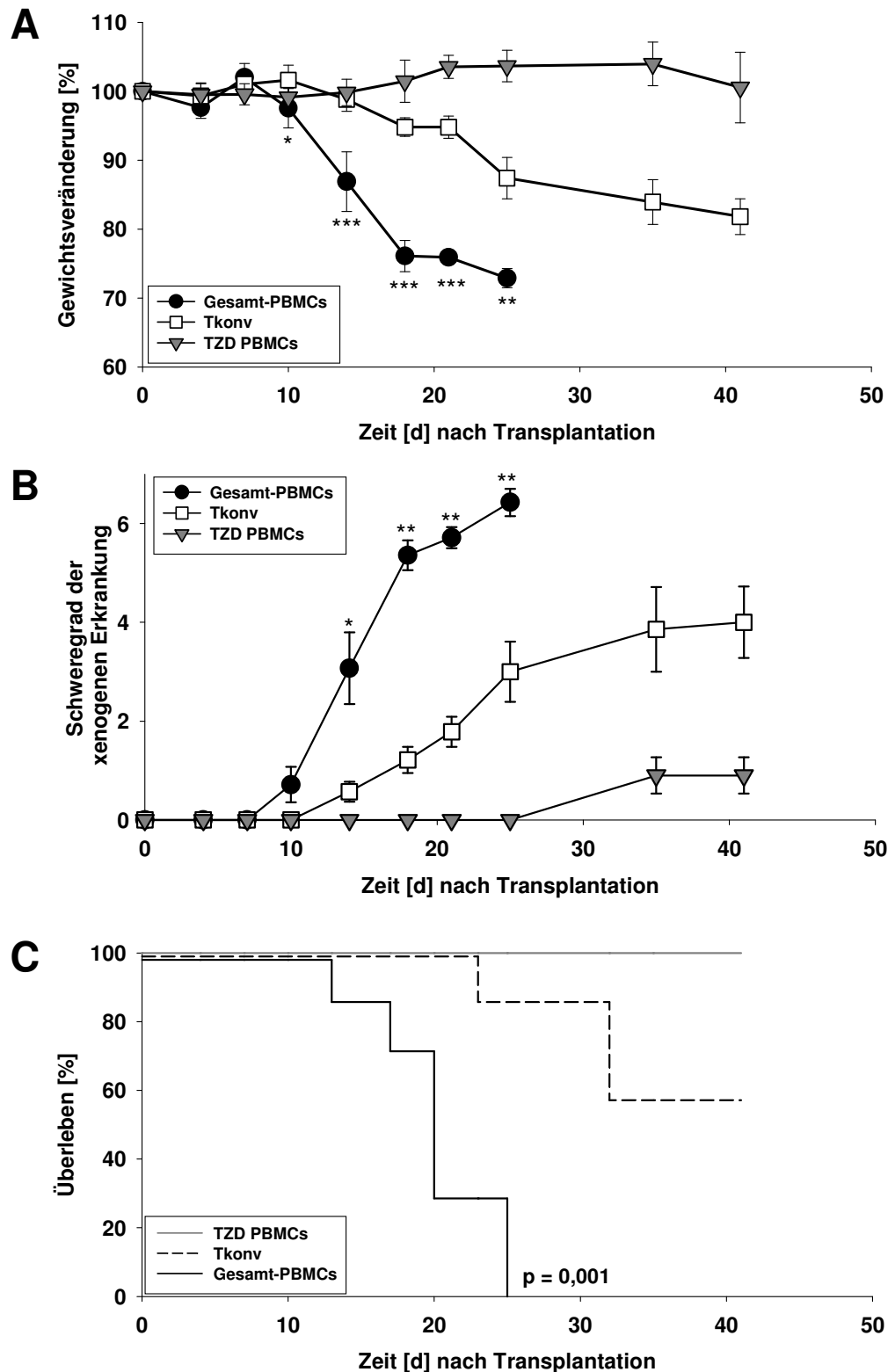


Abb. 4-29: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach xenogener Transplantation. RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 30×10^6 Gesamt-PBMCs, 18×10^6 Tkonv-Zellen bzw. 12×10^6 TZD PBMCs transplantiert. Die Ermittlung des Gewichts (A) sowie die Bewertung der xenogenen Erkrankung (B) anhand eines Beurteilungsschemas erfolgten zweimal wöchentlich. Das Überleben (C) der Tiere wurde täglich kontrolliert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 2 unabhängigen Experimenten ($n = 5-8$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (A *student's t-Test*, B Mann-Whitney-Test bzw. C *log-rank-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle (TZD PBMCs).

Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die xenogene Erkrankung erwartungsgemäß durch xenoreaktive T-Zellen ausgelöst wird. Im Unterschied zum murinen Modell der akuten GvHD ist es jedoch nicht ausreichend, isolierte Tkonv-Zellen zu transplantieren, um die xenogene Erkrankung zu induzieren. Offensichtlich scheinen andere hämatopoetische Zellen in den PBMCs das Engraftment xenoreaktiver T-Zellen zu fördern und dadurch die Erkrankung zu verstärken. Deshalb wurden zur Induktion der xenogenen Erkrankung in Nachfolgeexperimenten humane Gesamt-PBMCs (hPBMCs) transplantiert.

4.3.2.2 Kinetik des Engraftments humaner Zellen

Nachdem in publizierten Experimenten das Anwachsen humaner Zellen in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nur ungenau beschrieben wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit ihr Engraftment präzise untersucht werden. Hierfür wurde die Verteilung humaner Zellen in diversen Organen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation überprüft. Wie die Chimärismusanalysen nach xenogener Transplantation zeigten, findet zwischen Tag 7 und 10 eine starke Expansion humaner Zellen statt. Daher wurden die Analysezeitpunkte um diesen Zeitraum gelegt und die Verteilung humaner Zellen 4, 7, 10, 14 und 17 Tage nach xenogener Transplantation in KM, Milz und PB bestimmt.

Da die Zusammensetzung der hPBMCs – insbesondere bezüglich des Verhältnisses von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen – Spender-abhängig variiert, wurden hPBMCs in definierter Komposition transplantiert, um so möglichst konstante Versuchsbedingungen zu schaffen. Hierfür wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels MACS mit einer Reinheit von > 95 % separiert. Zur Induktion der xenogenen Erkrankung wurden 20 x 10⁶ hPBMCs bestehend aus 10 x 10⁶ T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Verhältnis 2:1) und 10 x 10⁶ TZD PBMCs transplantiert.

Abb. 4-30 zeigt die absolute Zahl hCD45⁺ Zellen in Bezug zur Gesamt-Zellzahl in KM (**A**) und Milz (**B**). Im KM konnte zu frühen Zeitpunkten nur eine geringe Zahl hCD45⁺ Zellen ($0,04 \pm 0,01 \times 10^6$ an Tag 4) nachgewiesen werden, die im Zeitverlauf leicht anstieg ($0,4 \pm 0,1 \times 10^6$ an Tag 17). Im Unterschied dazu enthielt die Milz bereits an Tag 4 nach Transplantation $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ hCD45⁺ Zellen, deren Zahl bis Tag 10 um das 80-fache auf $29 \pm 6 \times 10^6$ anstieg. Aus dieser starken Vermehrung der hCD45⁺ Zellen in der Milz lässt sich schließen, dass das primäre Engraftment und die Expansion humaner Zellen in der Milz stattfinden. Dies war auch makroskopisch anhand der sich entwickelnden Splenomegalie ersichtlich. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Expansion humaner Zellen ein Maximum und die Zellzahl blieb bis Tag 17 konstant.

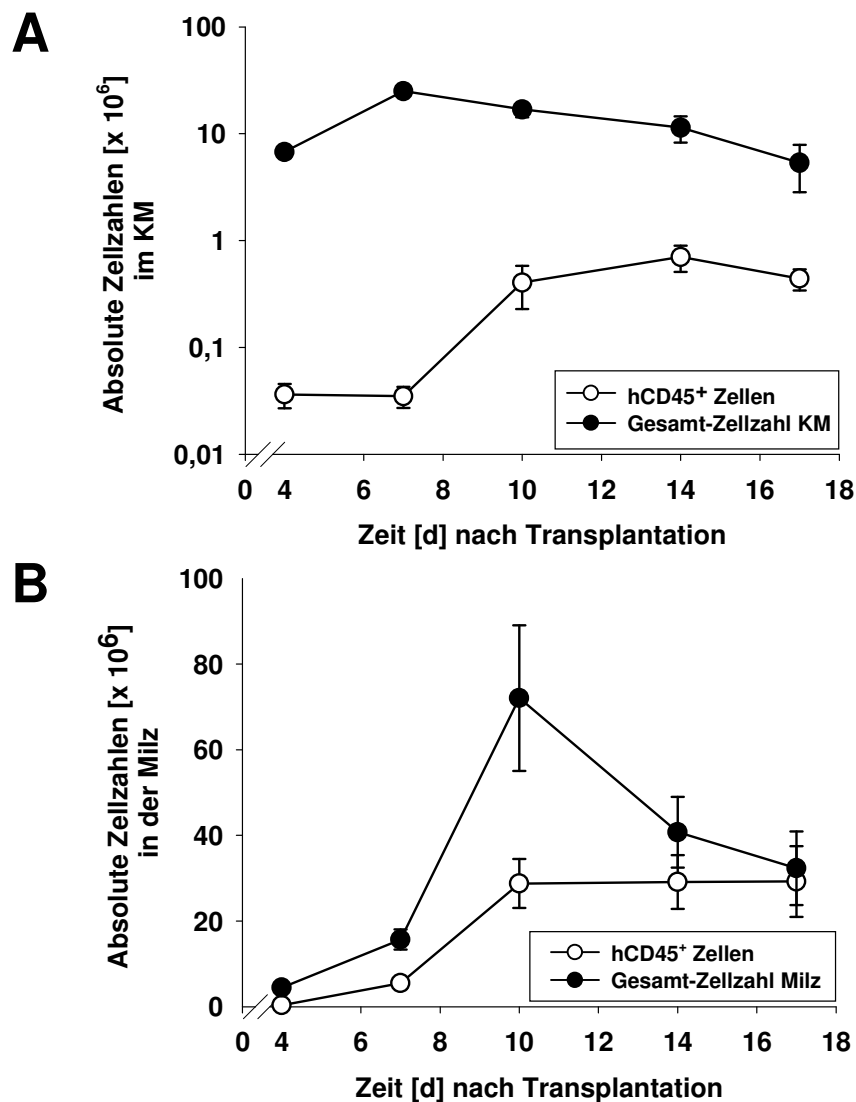


Abb. 4-30: Verteilung hCD45⁺ Zellen in KM und Milz von RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäusen nach xenogener Transplantation.

RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20×10^6 hPBMCs transplantiert. 4, 7, 10, 14 und 17 Tage nach Transplantation wurden Milz- und KM-Zellsuspensionen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen hCD45 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der hCD45⁺ Zellen im Vergleich zur Gesamt-Zellzahl in (A) KM und (B) Milz. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten dar ($n = 6-9$).

4.3.2.3 Expansion humaner Zellsubpopulationen in der Milz

Nachdem die Milz als Ort des Engraftments und der Expansion humaner Zellen identifiziert wurde, sollte in einer weiterführenden Analyse überprüft werden, welche hämatopoetischen Zellpopulationen expandieren und an der Induktion der xenogenen Erkrankung beteiligt sind. Dazu wurde 4, 7, 10, 14 und 17 Tage nach Transplantation die Verteilung humaner T-, B- und NK-Zellen sowie von Monozyten und Granulozyten in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Parallel wurden zur Bestimmung der Zytokinproduktion humaner Zellen Blutproben entnommen und der Gehalt humaner Th1/Th2-Zytokine im Serum analysiert.

Zu den untersuchten Zeitpunkten konnten in der Milz vorwiegend Lymphozyten detektiert werden. **Abb. 4-31A** zeigt die Expansion humaner CD19⁺ B-Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach xenogener Transplantation. Bis Tag 10 expandierten sowohl humane B-Zellen als auch T-Zellen, wobei die B-Zellpopulation bis zu diesem Zeitpunkt am prominentesten war.

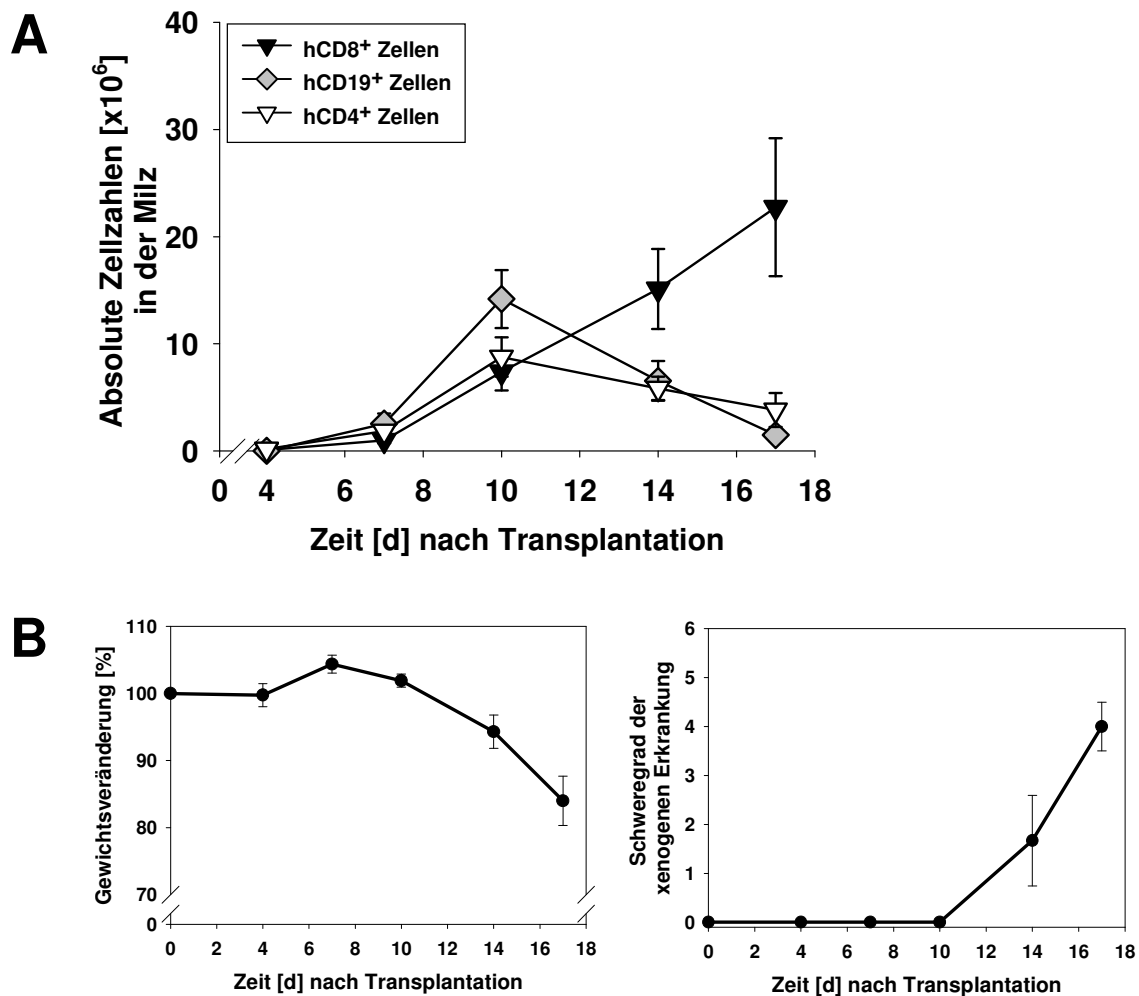


Abb. 4-31: Expansion humaner Lymphozyten in der Milz von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nach xenogener Transplantation.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert. 4, 7, 10, 14 und 17 Tage nach Transplantation wurden Milzzellsuspensionen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen hCD45, hCD8, hCD4 sowie hCD19 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind **(A)** die absoluten Zellzahlen CD4⁺ und CD8⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen der Milz und **(B)** Gewichtsverlauf und Schweregrad der xGvHD. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (*n* = 6-9).

An Tag 10 betrug der Anteil humaner B-Zellen innerhalb der hCD45⁺ Zellen 49 % (14,2 ± 2,7 x 10⁶), der Anteil CD4⁺ T-Zellen 29 % (8,8 ± 1,8 x 10⁶) und CD8⁺ T-Zellen 24 % (7,4 ± 1,7 x 10⁶). Ab Tag 10 zeigte sich eine präferentielle Expansion CD8⁺ T-Zellen, so dass ihr Anteil innerhalb der humanen Zellen an Tag 14 auf 52 % (15,1 ± 3,7 x 10⁶) und an Tag 17 auf 78 % (22,7 ± 6,4 x 10⁶) anstieg. Parallel dazu nahmen die B-Zell- und CD4⁺ T-Zellzahlen

ab. Wie in **Abb. 4-31B** dargestellt, verloren xenogen transplantierte RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse parallel zur Expansion der CD8⁺ T-Zellen ab Tag 10 verstärkt Gewicht und entwickelten kontinuierlich zunehmende Zeichen der xenogenen Erkrankung.

Da die akute GvHD mit einer verstärkten Produktion der Th1-Zytokine IFNγ, IL-2 und TNF einhergeht [260], wurde überprüft, welche Zytokine bei der xenogenen Erkrankung vermehrt gebildet werden. Hierzu wurden Serumproben mit Hilfe des *cytometric bead array* (CBA) analysiert und die Spiegel der humanen Zytokine IFNγ, TNF, IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 an Tag 4, 7, 10, 14 und 17 nach Transplantation quantitativ bestimmt. Um mögliche Kreuzreaktionen mit murinen Zytokinen auszuschließen, wurde als Negativkontrolle das Serum einer nicht-transplantierten RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Maus mitgeführt, wobei keine Kreuzreaktion mit murinen Zytokinen festgestellt werden konnte. Die erhöht nachweisbaren Zytokine waren IL-5, IL-10 und IFNγ (**Abb. 4-32**). Humanes IFNγ war zu jedem Zeitpunkt detektierbar, während die Konzentration von IL-5 und IL-10 erst zu späten Messzeitpunkten anstieg. Die IFNγ-Produktion stieg im Zeitverlauf kontinuierlich an und erreichte ihr Maximum an Tag 10, dem Zeitpunkt der stärksten Expansion humaner CD4⁺ T-Zellen (vgl. **Abb 4-31A**). Mit der Abnahme CD4⁺ T-Zellen sank auch die Konzentration von humanem IFNγ im Serum, wobei sowohl an Tag 14 mit 8014 pg/ml als auch an Tag 17 mit 5463 pg/ml noch große Mengen detektierbar waren. Die IL-5-Produktion stieg ebenfalls im Zeitverlauf kontinuierlich an, erreichte an Tag 10 ein Maximum (165 pg/ml) und nahm parallel zur Reduktion der CD4⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen in der Milz bis Tag 17 (14 pg/ml) kontinuierlich ab. Humanes IL-10 wurde an Tag 10 (30 pg/ml) und 14 (10 pg/ml) nur in geringen Mengen detektiert, während IL-2 oder IL-4 nicht und TNF (< 10 pg/ml) nur in minimaler Konzentration gefunden wurden.

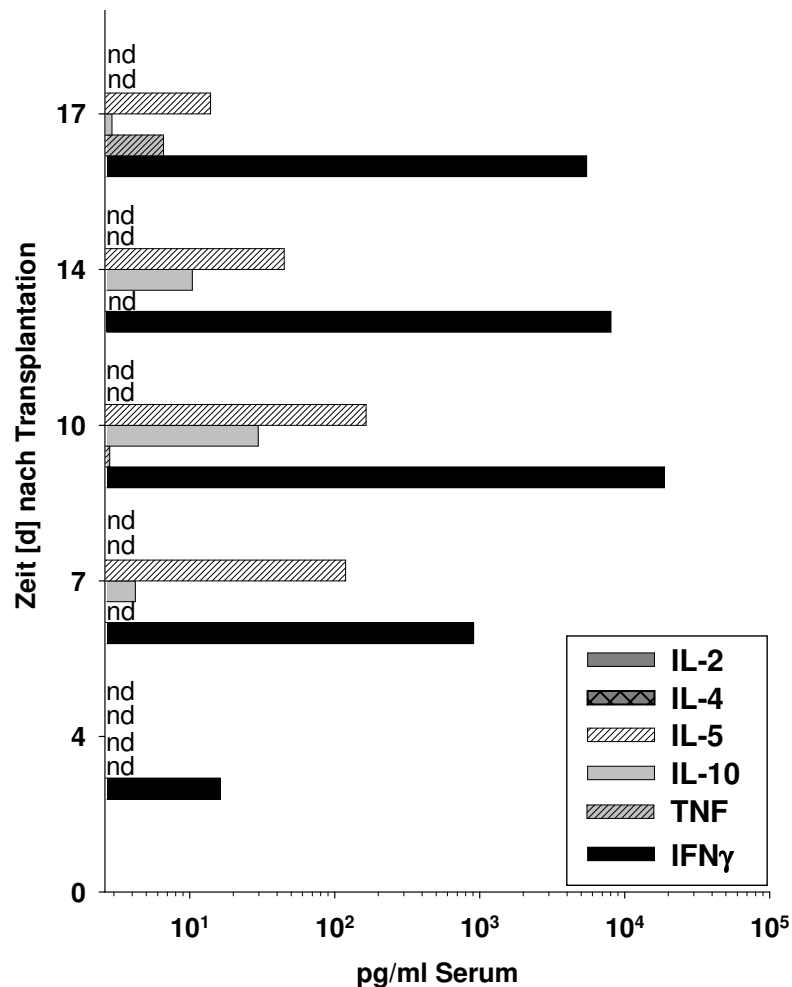


Abb. 4-32: Quantitative Analyse humaner Zytokine im Serum von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nach xenogener Transplantation.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert. 4, 7, 10, 14 und 17 Tage nach Transplantation wurde Serum gewonnen und der Gehalt an humanem IFN γ , TNF, IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 mittels CBA (*cytometric bead array*) durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment ($n = 3$).

Diese Daten zeigten, dass nach xenogener Transplantation die Milz das primäre Organ des Engraftments und der Expansion humaner Zellen darstellt. An der Induktion der xenogenen Erkrankung sind sowohl B-Zellen als auch konventionelle T-Zellen beteiligt. Die Effektorphase der xenogenen Erkrankung wird jedoch hauptsächlich von CD8⁺ CTLs dominiert.

4.3.2.4 Zielorgane der xenogenen Erkrankung

Die primären Zielorgane der akuten GvHD des Menschen sind Darm, Haut und Leber [250]. Außerdem werden häufig Schäden der Lunge beobachtet, die bisher als idiopathisches Pneumoniesyndrom bezeichnet werden, aber ebenfalls auf eine alloreaktive Schädigung zurückzuführen sind [261]. Um zu untersuchen, ob diese Organe auch im Rahmen der

xenogenen Erkrankung betroffen sind, wurden Gewebsschnitte von Lunge, Leber, Dick- und Dünndarm sowie der Haut erkrankter Tieren angefertigt, HE gefärbt und histologisch beurteilt.

Die histopathologische Analyse der Lunge (**Abb. 4-33A**) zeigte im Vergleich zur Kontrolle perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate, während parenchymale und peribronchiale Infiltrate weniger stark ausgeprägt waren. Darüber hinaus konnte eine Fibrosierung des Gewebes festgestellt werden. Auch in der Leber (**Abb. 4-33B**) wurden lymphozytäre Infiltrate beobachtet, die vornehmlich die Gallengänge betreffen. Darüberhinaus zeigten sich Erweiterungen des Periportaltraktes, eine vaskuläre Endothelitis sowie eine Gewebsfibrose. Überraschenderweise fanden sich in erkrankten Tiere nach xenogener Transplantation weder pathologisch relevante Veränderungen des Darms (**Abb. 4-33C**) noch der Haut (**Abb. 4-33D**). Im Einklang mit der histologischen Analyse entwickelten die Tiere (im Unterschied zu Mäusen mit akuter allogener GvHD) weder eine Diarrhö noch zeigten sie charakteristische erythematöse Veränderungen des Hautbildes.

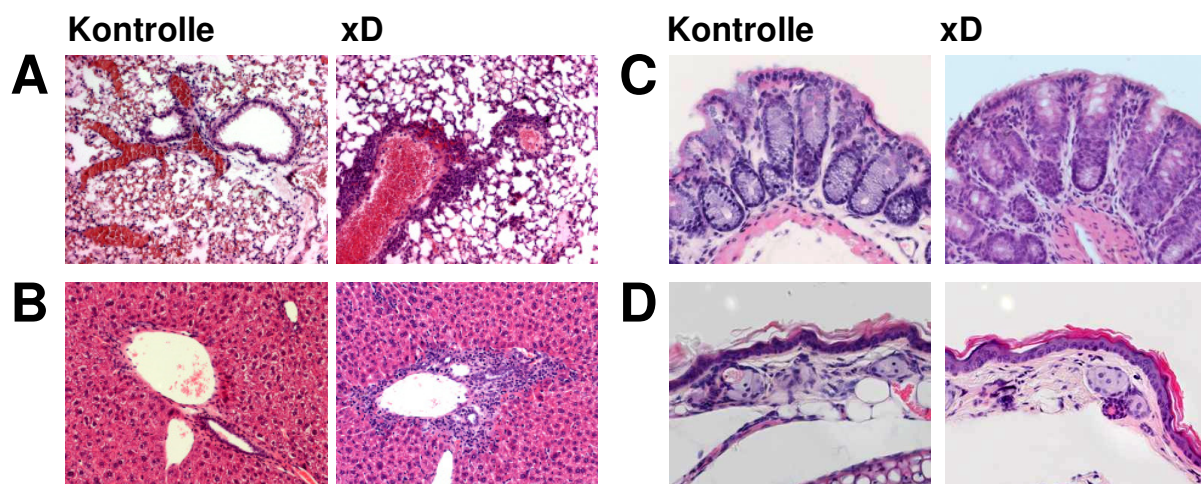


Abb. 4-33: Histologie der Lunge, Leber, Haut und des Darms von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nach xenogener Transplantation.

Paraffinschnitte der Lunge, Leber, Haut und des Darms wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. (A) Lunge, (B) Leber, (C) Darm und (D) der Haut einer nach Transplantation von 20×10^6 hPBMCs erkrankten Maus (xD). Aufnahmen entstanden bei 200-facher Vergrößerung. Als Kontrolle diente eine naive RAG2^{-/-}γc^{-/-} Maus.

Diese Untersuchungen zeigten, dass die xenogene Erkrankung nicht, wie erwartet, mit den pathologischen Veränderungen der akuten GvHD in allogenen Modellen oder der akuten GvHD des Menschen vergleichbar ist. Es ließen sich lediglich vergleichsweise diskrete Veränderungen in der Lunge und Leber identifizieren, nicht jedoch Zerstörungen des gastrointestinalen Gewebes, die für die GvHD-Letalität in Mausmodellen und Patienten hauptsächlich verantwortlich sind.

4.3.2.5 Einfluss humaner Zellen auf die murine Hämatopoese

Wie anhand der Chimärismusanalyse xenogen transplanteder RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse gezeigt werden konnte, geht die xenogene Erkrankung mit einer Abnahme muriner hämatopoetischer Zellen im PB einher. Klinisch zeigten die Mäuse im fortgeschrittenen Stadium der xenogenen Erkrankung eine ausgeprägte Tachypnoe, die nicht allein durch die diskreten pulmonalen Veränderungen zu erklären waren. Deshalb wurde der Einfluss der Expansion humaner Zellen auf die murine Hämatopoese genauer untersucht. Hierzu wurden 4, 7, 10, 14 und 17 Tage nach Transplantation das PB, KM und Milz hinsichtlich der Verteilung muriner hämatopoetischer Zellen analysiert.

Die Transplantation von 20×10^6 hPBMCs führte früh zu einem starken Anstieg der Frequenz hCD45⁺ Zellen im PB, erreichte nach 14 Tagen mit 76 % einen mit Vorexperimenten (**Abb. 4-28**) vergleichbaren Wert (**Abb. 4-34A**) und war mit einer Abnahme muriner CD45⁺ Zellen (mCD45⁺) verbunden. Um die absoluten Zellzahlen muriner hämatopoetischer Zellen in KM und Milz vergleichend untersuchen zu können, wurden RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse subletal bestrahlt, nicht xenogen transplantiert und zu den angegebenen Zeitpunkten parallel analysiert. Analog zu Bestrahlungskontrollen nahm die Gesamtzellzahl im KM xenogen transplanteder RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse an Tag 4 von ursprünglich $27,5 \pm 1,6 \times 10^6$ KM-Zellen um 75 % ab (**Abb. 4-34B**). Diese Abnahme resultierte überwiegend aus der Zytotoxizität der Bestrahlung. Während Bestrahlungskontrollen nur eine transiente Zytopenie entwickelten und sich innerhalb von 17 Tagen auf Normalwerte erholten ($30,3 \pm 1,6 \times 10^6$), enthielt das KM von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nach Transplantation von hPBMCs an Tag 17 nur noch $5,35 \pm 2,5 \times 10^6$ Zellen. Wie initial gezeigt, ist die Hämatopoese in KM und Milz von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen durch einen hohen Anteil (≥ 50 %) TER-119-exprimierender muriner erythroider Vorläuferzellen (MEP) charakterisiert (**Abb. 4-27**). Die Bestimmung TER-119⁺ Zellen nach xenogener Transplantation zeigte parallel zum Anstieg der humanen Zellen einen Verlust der MEP-Zellen in Milz (**Abb. 4-34C**) und KM (**Abb. 4-34D**). Die absolute Zahl der MEP-Zellen nahm im Vergleich zu naiven RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen 17 Tage nach xenogener Transplantation im KM um 93 % ($0,6 \pm 0,3 \times 10^6$) und in der Milz um 88 % ($1,3 \pm 0,9 \times 10^6$) ab. Im Unterschied hierzu erholte sich die Hämatopoese der Bestrahlungskontrollen bis Tag 17 auf Normalwerte, im KM kam es sogar zur überschießenden Regeneration (**Abb. 4-34D**).

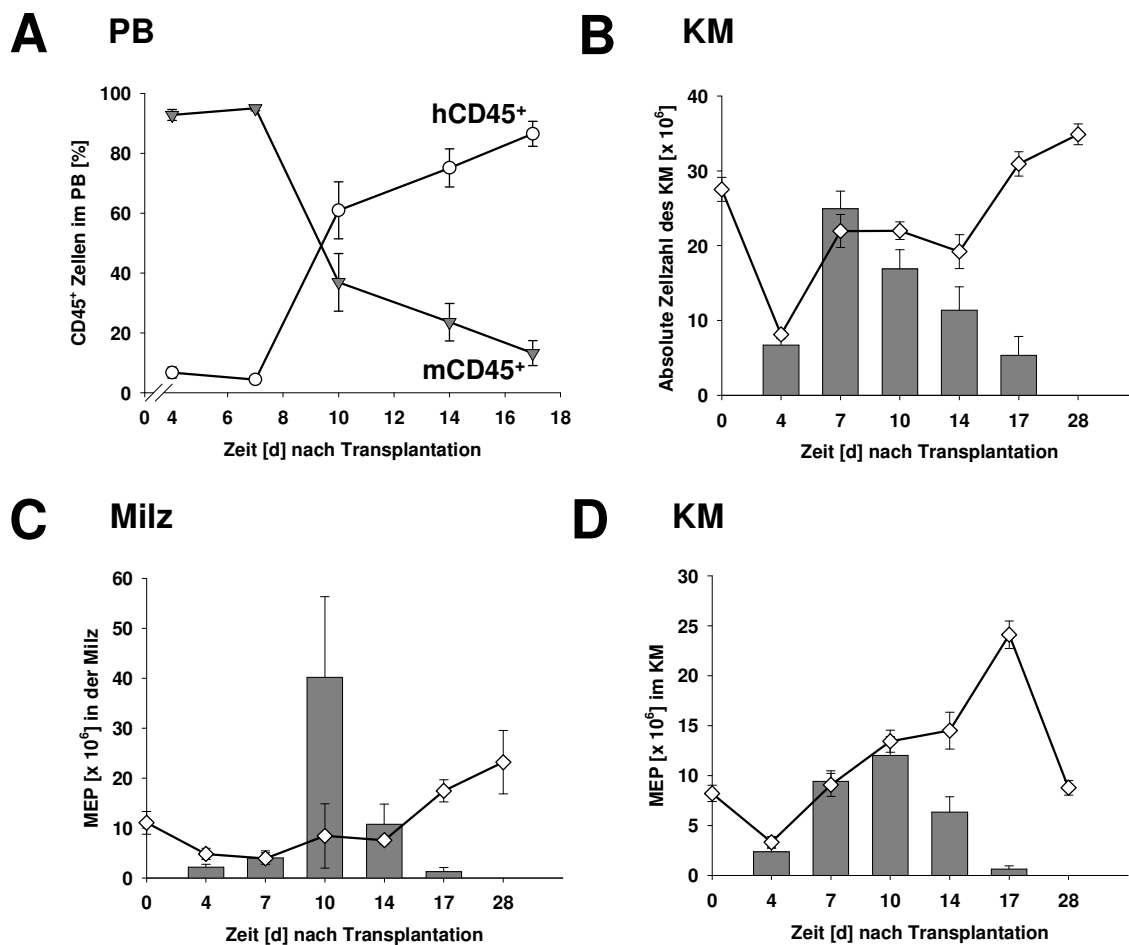


Abb. 4-34: Zelluläre Zusammensetzung des PB, der Milz und des KM von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nach xenogener Transplantation.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden sublethal bestrahlt (3,5 Gy) und mit 20×10^6 hPBMCs transplantiert. 4, 7, 10, 14 und 17 Tage nach Transplantation wurden das PB sowie KM- und Milzzellsuspensionen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen mCD45, hCD45 sowie mTER-119 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Relativer Anteil mCD45⁺ und hCD45⁺ Zellen im PB. (B) Gesamtzellzahl des KM (Femur und Tibia aus beiden Hinterläufen) und absolute Zahl der MEP Zellen in (C) Milz und (D) KM nach xenogener Transplantation (Balken) im Vergleich zur Bestrahlungskontrolle (Kurve). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten ($n = 6-9$).

Siebzehn Tage nach Transplantation mit hPBMCs zeigten die Tiere zwar schon deutliche Zeichen der xenogenen Erkrankung, ein Großteil starb jedoch erst ab Tag 21 (Abb. 4-29A). Um die Todesursache von Tieren mit fortgeschrittener xenogener Erkrankung (*xenogeneic disease*, xD) zu beurteilen, wurden KM und Milz präfinaler Tiere analysiert. Wie in Abb. 4-35 dargestellt, zeigte sich eine starke Reduktion der Absolutzahlen muriner CD45⁺ Zellen als auch von MEP-Zellen in beiden Organen. Im Vergleich zur Kontrolle war in der Milz die Zahl der mCD45⁺ Zellen um 80 % reduziert, die der MEP-Zellen um 78 %. Diese Veränderungen waren im KM noch deutlicher, da die mCD45⁺ Zellen um 99,3 %, die MEP-Zellen um 99,9% reduziert waren, so dass praktisch kein blutbildendes Mark mehr vorhanden war. Daraus

konnte geschlossen werden, dass die xenogene Erkrankung primär durch eine Abstoßung der murinen Hämatopoese hervorgerufen wird.

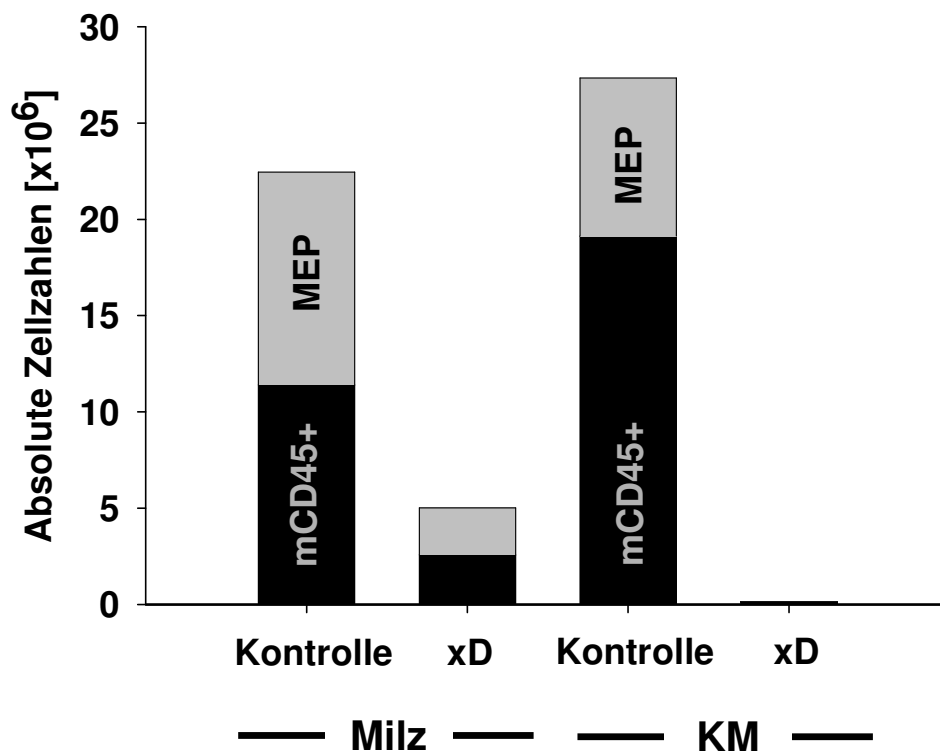


Abb. 4-35: Zelluläre Zusammensetzung der Milz und des KM von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nach xenogener Transplantation.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert. Zum Zeitpunkt starker (Schweregrad 6) xenogener Erkrankung (xD) wurden KM- und Milzzellsuspensionen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen mCD45, hCD45 sowie mTER-119 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 5 Tieren ($n = 5$). Als Kontrolle dienten unbehandelte RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse.

Die Abstoßung der murinen Hämatopoese ließ sich auch histologisch bestätigen. Die Milz der Tiere war zellarm und komplett fibrosiert, Megakaryozyten und Erythrone als Zeichen der extramedullären Blutbildung ließen sich nicht mehr nachweisen (**Abb. 4-36A**). Ebenso war das blutbildende Mark im Knochen komplett durch Fettmark ersetzt (**Abb. 4-36B**).

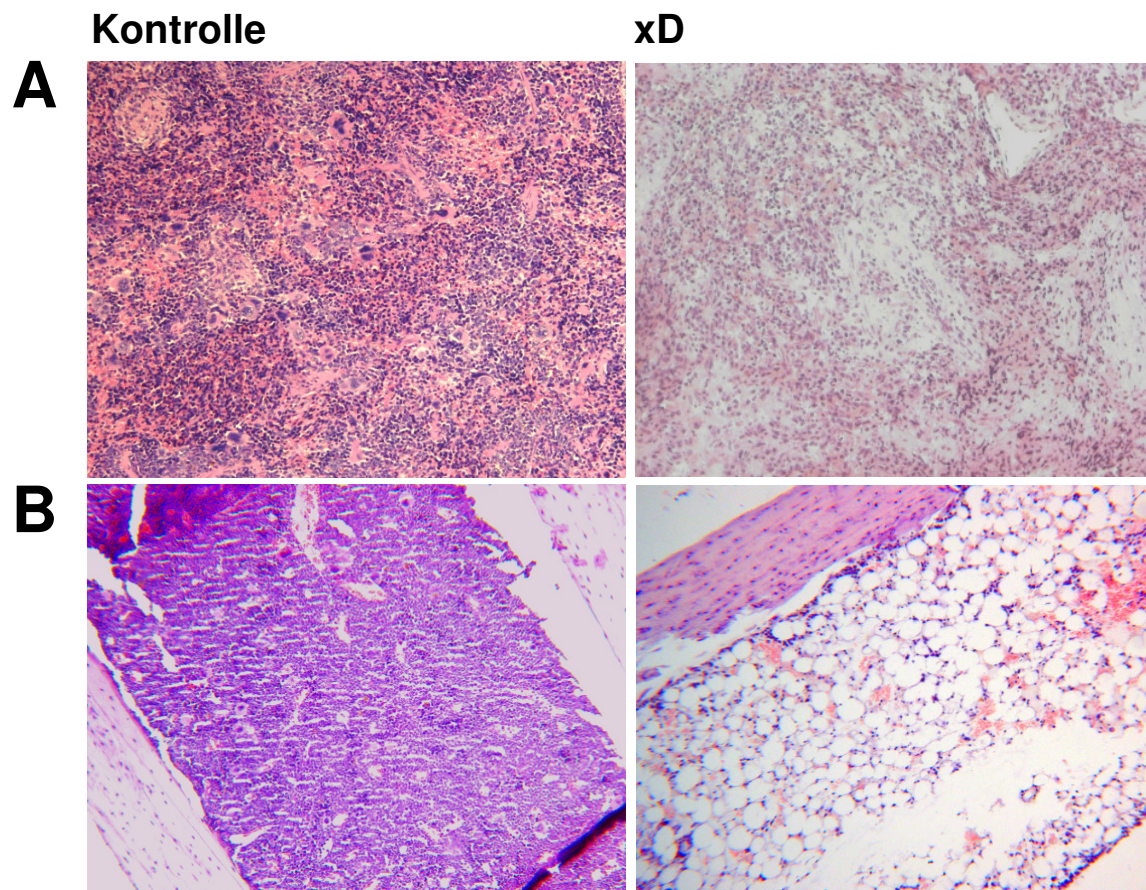


Abb. 4-36: Histologie der Milz und des KM von $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäusen nach xenogener Transplantation.

Paraffinschnitte von Milz und KM wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. (A) Milz und (B) KM einer nach Transplantation von 20×10^6 hPBMCs erkrankten Maus (xD). Aufnahmen entstanden bei 63-facher (KM) bzw. 100-facher (Milz) Vergrößerung. Als Kontrolle diente eine unbehandelte $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Maus.

4.3.3 Adoptiver Transfer *in vitro* expandierter humaner Treg-Zellen

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die durch Transfer von hPBMCs erzeugte xenogene Erkrankung in $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäusen kaum mit der Pathologie der GvHD übereinstimmt und das Modell deshalb zur Untersuchung GvHD-relevanter Fragestellungen nur begrenzt geeignet scheint. Der Tod der Tiere wird vielmehr durch die Abstoßung der murinen Hämatopoese und der daraus resultierenden Anämie verursacht. Unter der Hypothese, dass die suppressive Aktivität *in vitro* expandierter humaner Treg-Zellen die Expansion von humanen Tkonv-Zellen unterdrückt und dadurch die Abstoßung der murinen Hämatopoese verhindern könnte, wurden adoptive Transfer-Experimente durchgeführt, um die Funktion der *in vitro* expandierten RA^+ und RA^- Treg-Subpopulationen *in vivo* zu untersuchen.

4.3.3.1 Der Einfluss *in vitro* expandierter humaner Treg-Zellen auf das Überleben nach xenogener Transplantation

Um den Einfluss der *in vitro* expandierten Treg-Subpopulationen auf das Überleben nach xenogener Transplantation zu untersuchen wurden Kontrolltiere mit hPBMCs transplantiert, während Tiere der Treg-Gruppen entweder mit *in vitro* expandierten RA⁺ oder RA⁻ Treg-Zellen kotransplantiert wurden. Da in Mausmodellen der akuten GvHD ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Tkonv-Zellen und Treg-Zellen den wirksamsten Schutz vor letaler GvHD erzeugte [221], wurden die Treg-Subpopulationen im Verhältnis 1:1 mit Tkonv-Zellen transplantiert. Dazu wurden RA⁺ und RA⁻ Treg-Zellen im L-Zellkultursystem für 11 Tage expandiert und bis zum Zeitpunkt der Transplantation für weitere 4 Tage mit 300 U/ml IL-2 ohne Stimulation über CD3/CD28 ruhiggestellt. Wie in **Abb. 4-37** dargestellt, zeigten die Treg-Subpopulationen zu diesem Zeitpunkt deutliche Unterschiede im Phänotyp. RA⁺ Treg-Zellen zeigten erwartungsgemäß eine homogene Koexpression der Lymphknoten-*homing*-Rezeptoren CCR7 und CD62L und mehr als 90 % der Zellen exprimierten das FOXP3 Protein. Im Gegensatz dazu zeigten RA⁻ Treg-Zellen eine heterogene Verteilung von CCR7 und CD62L und schon 33 % der Zellen hatten ihre FOXP3-Expression verloren.

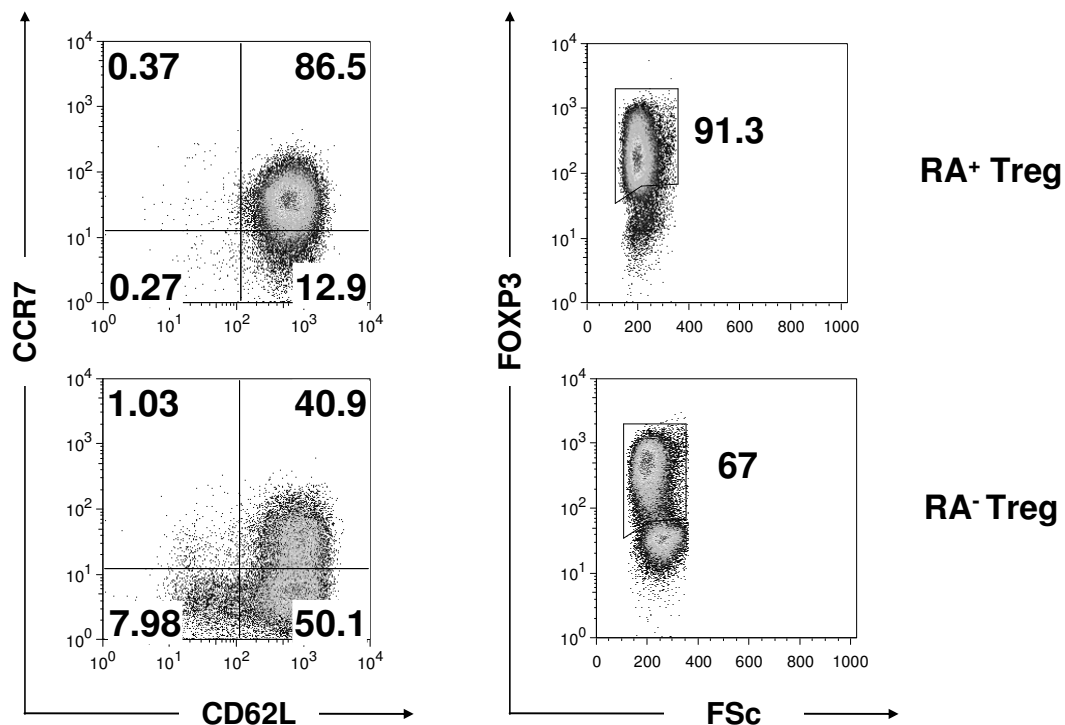


Abb. 4-37: Phänotyp *in vitro* expandierter RA⁺ und RA⁻ Treg-Zellen vor xenogener Transplantation.

RA⁺ und RA⁻ Treg-Zellen wurden aus Leukapheresaten gesunder Probanden durchflusszytometrisch sortiert und in der L-Zellkultur in Anwesenheit von 300 U/ml IL-2 für 11 Tage expandiert. Bis zur Transplantation wurden die Zellen für weitere 4 Tage ohne Stimulation über CD3/28 mit 300 U/ml IL-2 ruhiggestellt. Zur Bestimmung des Phänotyps wurden sie geerntet und zunächst mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD25, CD45RA, CCR7 und CD62L gefärbt. Anschließend wurden sie zur intranukleären Färbung von FOXP3 fixiert, permeabilisiert, FOXP3-markiert und dann durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist eine repräsentative Analyse.

Subletal bestrahlte RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden für das Experiment wie folgt transplantiert: Eine Behandlungsgruppe erhielt 20 x 10⁶ hPBMCs inklusive 10 x 10⁶ T-Zellen (CD4⁺:CD8⁺ 2:1); diese Tiere dienten als Positivkontrolle, da hier eine xenogene Erkrankung zu erwarten war. Eine weitere Gruppe von Tieren erhielt zusätzlich 10 x 10⁶ expandierte RA⁺ Treg-Zellen, die dritte Behandlungsgruppe 10 x 10⁶ expandierte RA⁻ Treg-Zellen.

Wie in **Abb. 4-38** dargestellt, zeigten die Blutuntersuchungen an Tag 14 einen signifikanten Unterschied im Anteil der hCD45⁺ Zellen im PB zwischen Kontrolltieren und Mäusen, die zusätzlich RA⁺ Treg-Zellen erhalten hatten. So betrug der Anteil hCD45⁺ Zellen in der Kontrollgruppe 40 ± 8 %, während die Frequenz hCD45⁺ Zellen nach adoptivem Transfer von RA⁺ Treg-Zellen mit 12 ± 4 % um 70 % gegenüber der Kontrolle reduziert war. Der Anteil der hCD45⁺ Zellen im PB von Tieren, die RA⁻ Treg-Zellen erhalten hatten, lag dagegen bei 30 ± 7,5 %. Bis Tag 21 stieg der Anteil der hCD45⁺ Zellen im PB nach adoptivem Transfer von RA⁺ Treg-Zellen auf 35 ± 9 % an, so dass kein signifikanter Unterschied mehr bestand im Vergleich zur Kontrollgruppe (45 ± 6 %) oder zu Tieren die RA⁻ Treg-Zellen erhalten hatten (37 ± 9 %).

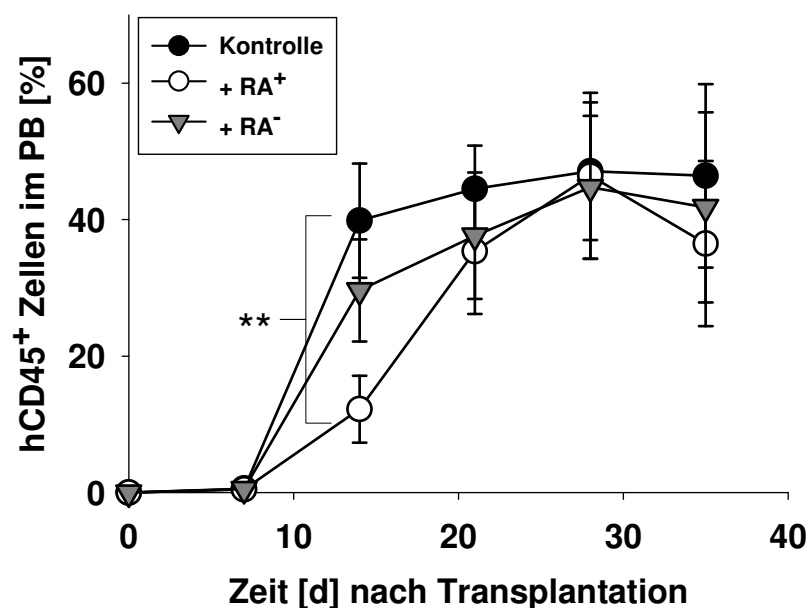


Abb. 4-38: Chimärismusanalyse nach adoptivem Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen.

RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert. Parallelgruppen erhielten zusätzlich 10 x 10⁶ *in vitro* expandierte RA⁺ oder RA⁻ Treg-Zellen. 7, 14, 21 und 37 Tage nach Transplantation wurden Blutuntersuchungen durchgeführt. Nach Erythrozyten-Lyse wurden die Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen humanes CD45 in Kombination mit mCD45, hCD4 und hCD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten ($n = 15-18$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (*student's t-Test*) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle (hPBMCs).

Mit Zunahme der hCD45⁺ Zellen im PB traten klinischen Zeichen der xenogenen Erkrankung auf und die Tiere verloren an Gewicht (**Abb. 4-39A und B**). Kontrolltiere verloren schon

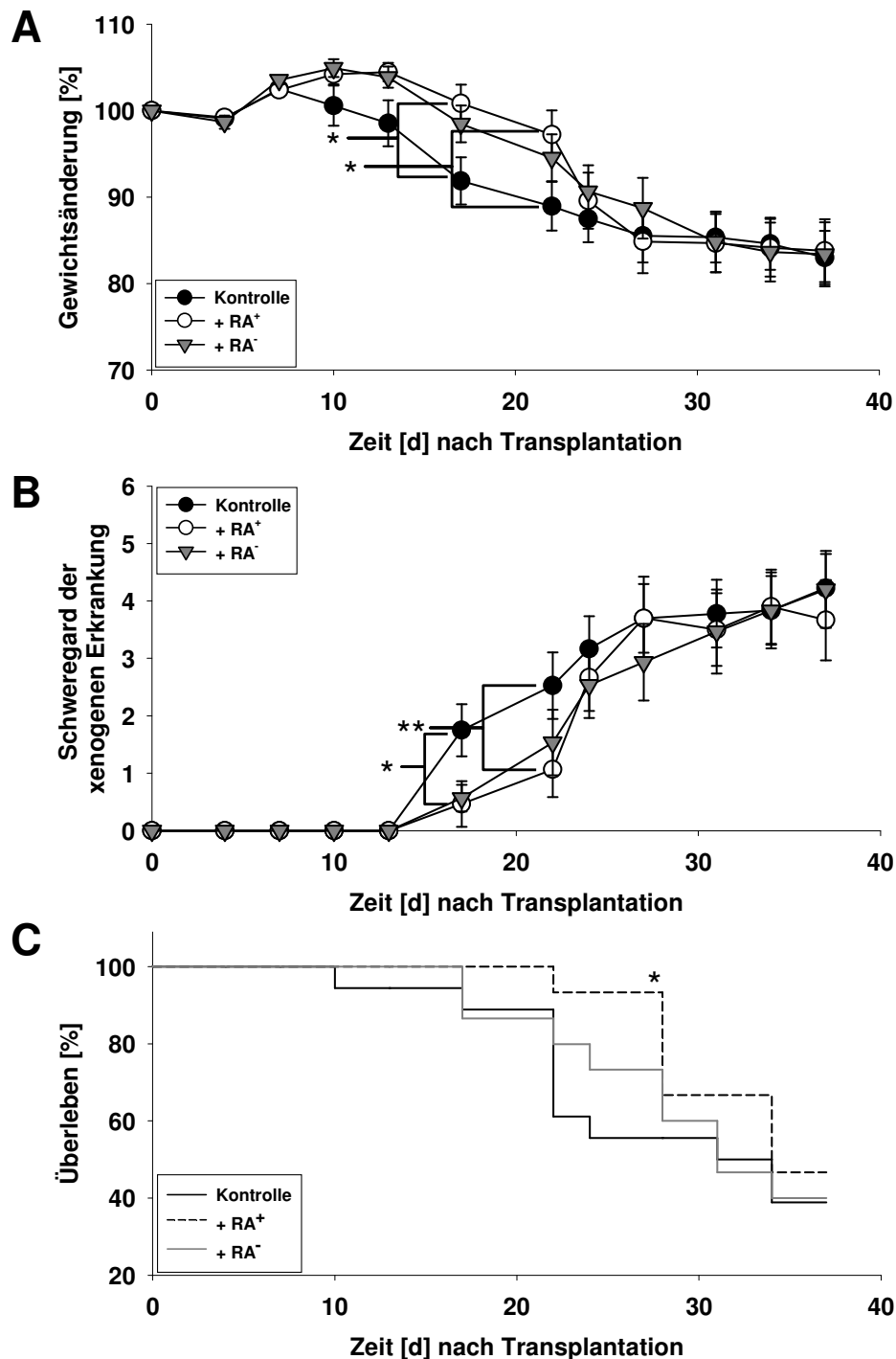


Abb. 4-39: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach adoptivem Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert. Parallelgruppen erhielten zusätzlich 10 x 10⁶ *in vitro* expandierte RA⁺ oder RA⁻ Treg-Zellen. Die Ermittlung des Gewichts (**A**) sowie die Bewertung der xenogenen Erkrankung anhand eines klinischen Scores (**B**) erfolgten zweimal wöchentlich. Das Überleben (**C**) der Tiere wurde täglich kontrolliert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten (*n* = 15-18). Sterne kennzeichnen Unterschiede (**A** *student's t*-Test, **B** Mann-Whitney-Test und **C** *log-rank*-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * *p* < 0,05, und ** *p* < 0,01 gegenüber der Kontrolle (hPBMCs).

14 Tage nach Transplantation kontinuierlich Gewicht und entwickelten einen hohen Krankheitsscore, während Tiere der Treg-Gruppen zunächst mildere Anzeichen und nur eine leichte Reduktion des Gewichts zeigten. Im Vergleich zur Kontrolle schützte der adoptive Transfer von RA⁺ Treg-Zellen die Tiere bis Tag 21 signifikant vor krankheitsbedingtem Gewichtsverlust und verringerte die klinische Symptomatik. Auch die Mortalität der Erkrankung war nach adoptivem Transfer von RA⁺ Treg-Zellen verzögert, so dass an Tag 28 noch 93,3 % der Tiere lebten (**Abb. 4-39C**), während zu diesem Zeitpunkt nur 55,6 % der Kontrolltiere und 66,6 % der Tiere, die RA⁻ Treg-Zellen erhalten hatten, überlebten. Die protektive Wirkung von RA⁺ Treg-Zellen war jedoch nur passager, da die Frequenz hCD45⁺ Zellen im PB im Verlauf anstieg, die Tiere ab Tag 21 zunehmend Gewicht verloren, klinische Zeichen der xenogenen Erkrankung entwickelten und ab Tag 28 an den Folgen der Erkrankung starben.

4.3.3.2 Migration und Überleben in *vitro* expandierter Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell

Nachdem *in vitro* expandierte RA⁺ Treg-Zellen nicht in der Lage waren RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse langfristig vor der Abstoßung der murinen Hämatopoese zu schützen, sollten mögliche Ursachen hierfür untersucht werden. Um zu überprüfen, ob expandierte humane Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell migrieren und überleben können, wurden sie zur Unterscheidung von konventionellen CD4⁺ T-Zellen mit CFSE gefärbt und zusammen mit hPBMCs in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse transferiert (Tkonv:Treg 1:1). An Tag 4 und 7 nach Transplantation wurde die Verteilung CD4⁺CFSE⁺ Treg-Zellen in Milz, PB sowie KM aus jeweils 3 Mäusen bestimmt.

Wie in **Abb. 4-40A** ersichtlich, konnte 4 Tage nach Transplantation in PB, KM und Milz eine klare Population CFSE⁺ Zellen unter den CD4⁺ T-Zellen detektiert werden. Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt war allerdings schon eine deutliche Verminderung CFSE-markierter Zellen im Vergleich zu unmarkierten CD4⁺ T-Zellen offensichtlich. Die Analyse an Tag 7 nach adoptivem Transfer ergab im Vergleich zu Tag 4 eine weitere Reduktion CFSE⁺ Zellen in den jeweiligen Kompartimenten. So nahm die Zahl CD4⁺CFSE⁺ Zellen der Milz von Tag 4 ($0,13 \pm 0,04 \times 10^6$) bis Tag 7 ($0,019 \pm 0,007 \times 10^6$) um 85 % ab (**Abb. 4-40B**). Bezogen auf das Verhältnis von konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu CD4⁺CFSE⁺ Zellen resultierte aus der gleichzeitigen Zunahme der humanen Tkonv-Zellen zwischen Tag 4 und 7 eine Verschiebung zugunsten der Tkonv-Zellen. So betrug das Tkonv:Treg Verhältnis an Tag 4 durchschnittlich 12:1, während es an Tag 7 auf 51:1 anstieg (**Abb. 4-40C**).

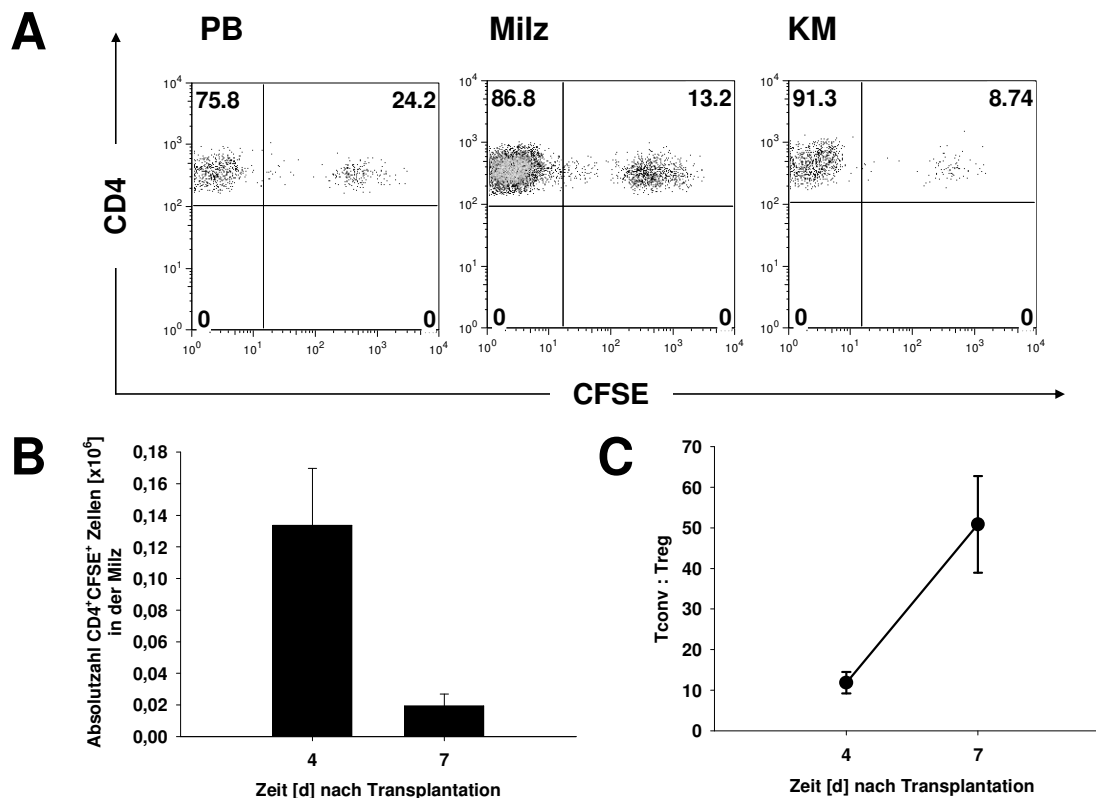


Abb. 4-40: Migration und Überleben *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen nach xenogener Transplantation.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden sublethal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs und 10 x 10⁶ *in vitro* expandierten CFSE-gefärbten RA⁺ Treg-Zellen transplantiert. Die Verteilung der CFSE⁺ Zellen in KM, PB und Milz wurde 4 und 7 Tage nach Transplantation durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Anteil CD4⁺CFSE⁺ Zellen in PB, KM und Milz 4 Tage nach adoptivem Transfer. **(B)** Absolute Zellzahl CD4⁺CFSE⁺ Treg-Zellen in der Milz und **(C)** Verhältnis von Tconv-Zellen zu CD4⁺CFSE⁺ Treg-Zellen in der Milz 4 und 7 Tage nach Transfer. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (*n* = 3).

Diese Ergebnisse zeigten, dass *in vitro* expandierte RA⁺ Treg-Zellen zwar in die Milz migrieren können, dort jedoch kaum überleben, da bereits 4 Tage nach adoptivem Transfer nur noch ein Bruchteil der ursprünglich transplantierten Zellen reisoliert werden konnte. Ein Verlust CFSE⁺ Zellen durch Verdünnung des Farbstoffs aufgrund starker *in vivo* Proliferation der RA⁺ Treg-Zellen wurde durch durchflusszytometrische FOXP3-Analysen in ähnlichen Experimenten ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

4.3.3.3 Einfluss von exogen zugeführtem humanem IL-2 auf die suppressive Aktivität *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell

IL-2 ist ein entscheidendes Zytokin für die Entwicklung, Expansion und das Überleben von natürlichen Treg-Zellen sowie für ihre suppressive Funktion [169, 262-267]. Nachdem im Serum von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen nach xenogener Transplantation kein humanes IL-2 detektiert werden konnte (**Abb. 4-32**) und natürliche Treg-Zellen nicht in der Lage sind IL-2 selbst zu produzieren [267], wurde untersucht, ob eine exogene Zufuhr von humanem IL-2

ihr Überleben und ihre suppressive Aktivität *in vivo* steigert. Dazu wurden RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse subletal bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs plus 10 x 10⁶ RA⁺ Treg-Zellen transplantiert. Einem Teil der Tiere wurde ab Tag 1 nach Transplantation über den gesamten Beobachtungszeitraum humanes IL-2 im Abstand von 24h intraperitoneal verabreicht.

Die Injektion von IL-2 hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den Gewichtsverlauf, den klinischen Score und das Überleben der Tiere (**Abb. 4-41A-C**).

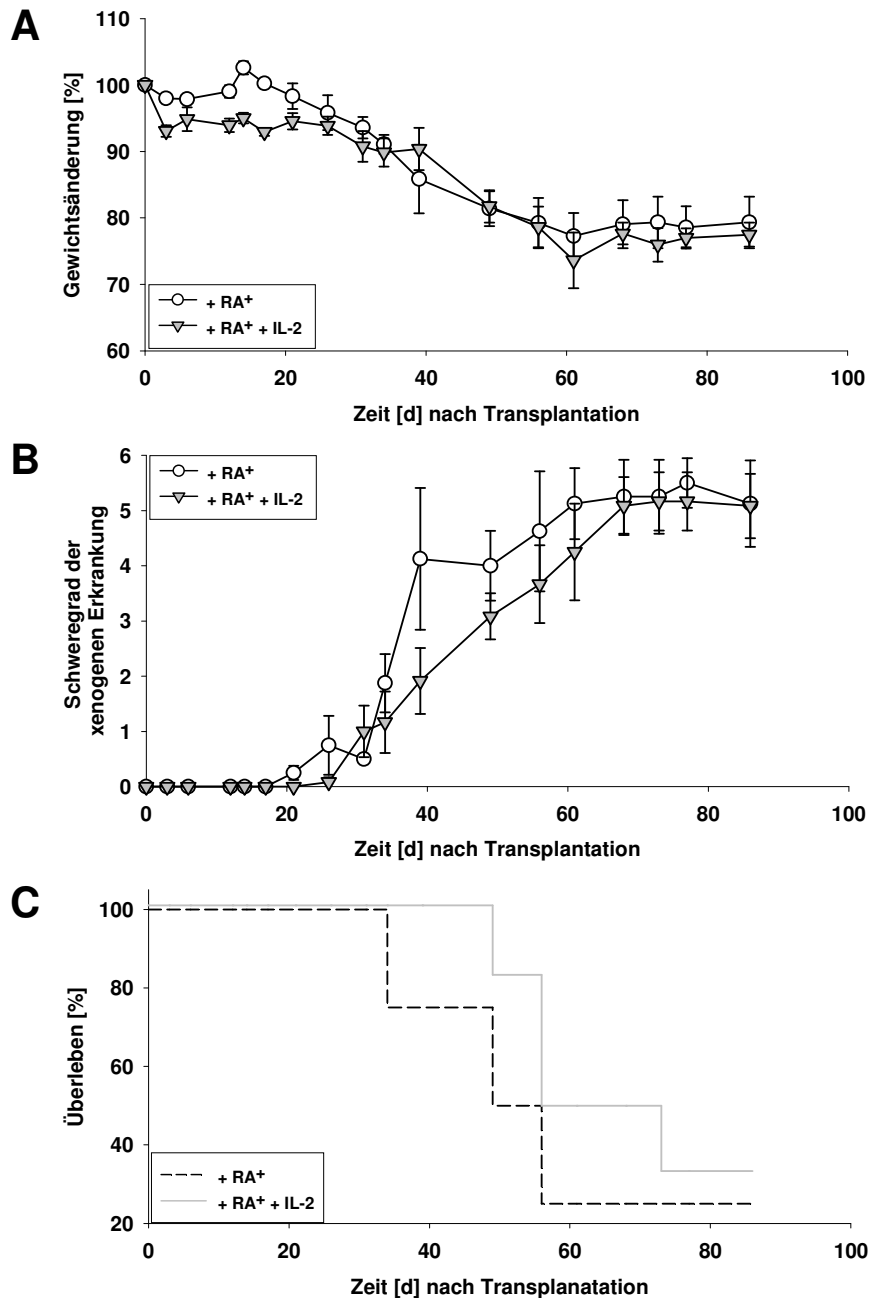


Abb. 4-41: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach adoptivem Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen und Administration von humanem IL-2.

Zehn RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt, mit 20 x 10⁶ hPBMCs und 10 x 10⁶ *in vitro* expandierten RA⁺ Treg-Zellen transplantiert. Fünf Tieren wurde 1 Tag nach Transplantation alle 24h rekombinantes humanes IL-2 (1000 U) intraperitoneal verabreicht. Die Ermittlung des Gewichts (**A**) sowie die Bewertung der xenogenen Erkrankung (**B**) anhand eines klinischen Scores erfolgten zweimal wöchentlich. Das Überleben (**C**) der Tiere wurde täglich kontrolliert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus einem Experiment ($n = 5$).

Daraus kann geschlossen werden, dass eine ungenügende IL-2-Versorgung nicht die alleinige Ursache für die nur transiente suppressive Wirkung adoptiv transferierter Treg-Zellen ist.

4.3.3.4 Verzögerter adoptiver Transfer *in vitro* expandierter Treg-Zellen

Da die Verabreichung von IL-2 keine Verbesserung der suppressiven Aktivität *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell bewirkte, wurde spekuliert, dass weitere Zytokine für das Überleben humaner Treg-Zellen unter xenogenen Bedingungen von Bedeutung sein könnten. Die Kinetik des Engraftments humaner Zellen zeigte, dass bereits 4 Tage nach Transplantation eine deutliche Zahl humaner Zellen den Weg in die Milz gefunden hatte (**Abb. 4-30B**). Der Expansion geht eine Aktivierung der humanen Zellen voraus und parallel dazu die Produktion proliferationsfördernder Zytokine. Unter der Annahme, dass ab Tag 4 die verstärkte Produktion humaner Zytokine ein Milieu schaffen könnte, das das Engraftment und Überleben *in vitro* expandierter humaner Treg-Zellen fördert, wurden RA⁺ und RA⁻ Treg-Zellen zeitverzögert transferiert. Dazu wurden RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse subletal bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert. An Tag 4 wie zuvor jeweils 10 x 10⁶ expandierte RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen.

Analog zu den vorigen Experimenten begannen Kontrolltiere ab Tag 14 Gewicht zu verlieren (**Abb. 4-42A**) und entwickelten ersten Zeichen der xenogenen Erkrankung (**Abb. 4-42B**). Der zeitverzögerte Transfer RA⁻ Treg-Zellen führte sogar zu einer Verstärkung der Erkrankung, so dass die Tiere ab Tag 14 schneller Gewicht verloren, einen höheren Krankheitsscore als Kontrolltiere aufwiesen und früher starben (**Abb. 4-42C**). Die Krankheitsentwicklung in Tieren, die zeitverzögert RA⁺ Treg-Zellen erhalten hatten, verlief hingegen wie in der Kontrollgruppe.

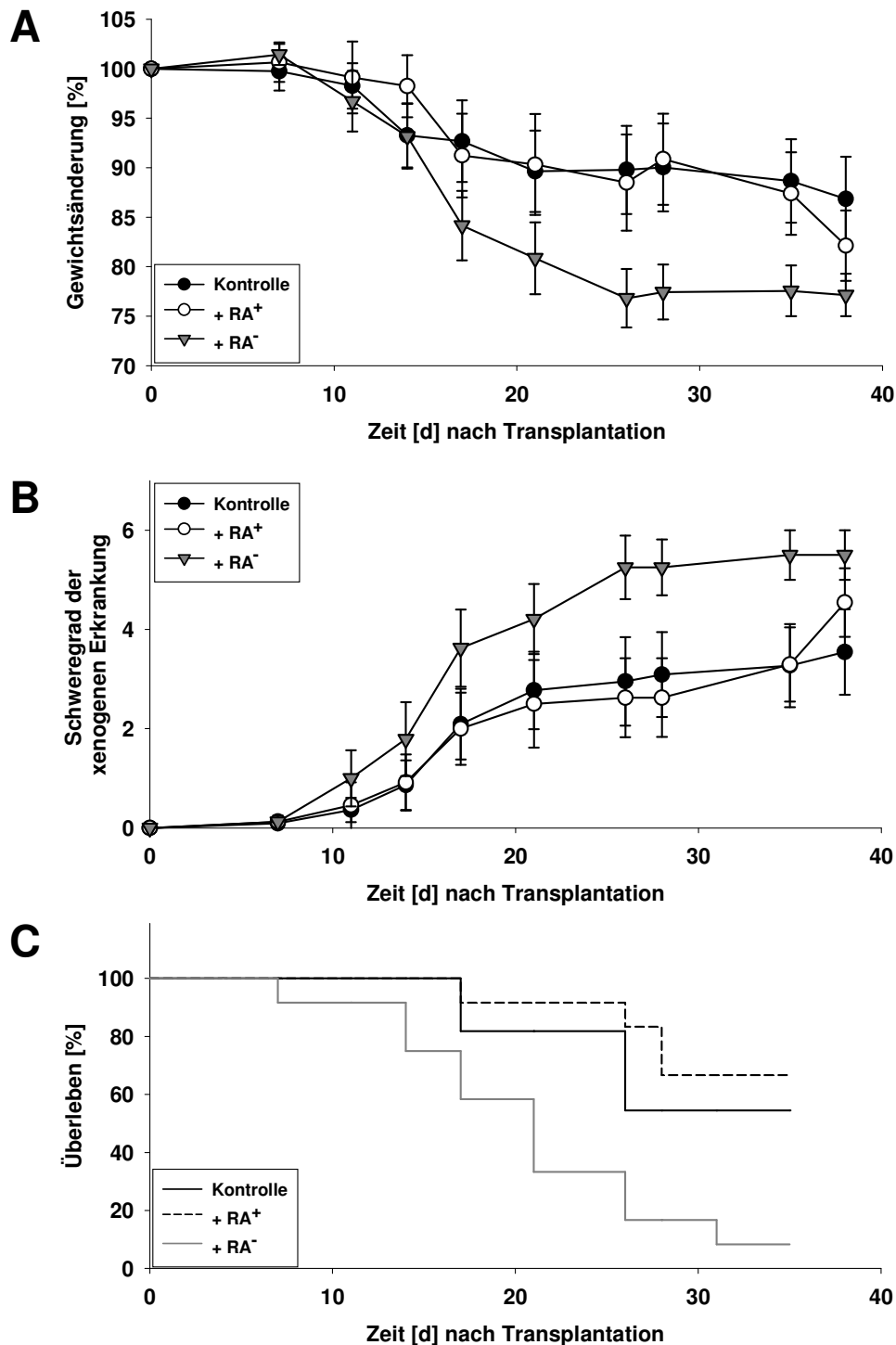


Abb. 4-42: Gewichtsverlauf, klinischer Score und Überleben nach zeitverzögertem Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen.

RAG2^{-/-}yc^{-/-} Mäuse wurden sublethal bestrahlt (3,5 Gy) und mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert. 4 Tage nach Transplantation erhielten Parallelgruppen zusätzlich 10 x 10⁶ *in vitro* expandierte RA⁺ oder RA⁻ Treg-Zellen. Die Ermittlung des Gewichts (**A**) sowie die Bewertung der xenogenen Erkrankung anhand eines klinischen Scores (**B**) erfolgten zweimal wöchentlich. Das Überleben (**C**) der Tiere wurde täglich kontrolliert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (n= 11-12).

4.3.3.5 Einfluss *in vitro* expandierter Treg-Zellen auf die frühe Expansion humaner Zellen

Wie hier gezeigt wurde, ist für die Abstoßung der murinen Hämatopoese eine starke Aktivierung und Expansion humaner T-Zellen erforderlich. Da der adoptive Transfer RA⁺ Treg-Zellen zumindest in der Frühphase nach Transplantation eine deutliche protektive Wirkung (**Abb. 4-38** und **4-39**) hatte, wurde der Einfluss *in vitro* expandierter Treg-Subpopulationen auf die frühe Expansion humaner Zellen *in vivo* untersucht. Dazu wurden RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse subletal bestrahlt, mit 20 x 10⁶ hPBMCs transplantiert und je eine Behandlungsgruppe erhielt zusätzlich 10 x 10⁶ *in vitro* expandierte RA⁺ oder RA⁻ Treg-Zellen. Zehn und 14 Tage nach Transplantation wurden humane Zellen aus der Milz von je 3 Tieren pro Behandlungsgruppe durchflusszytometrisch analysiert.

Der adoptive Transfer expandierter RA⁺ Treg-Zellen führte im Vergleich zu Kontrolltieren 10 Tage nach Transplantation zu einer signifikanten Reduktion humaner Zellen in der Milz (**Abb. 4-43A**). So enthielt die Milz der Kontrolltiere durchschnittlich $20 \pm 2,9 \times 10^6$ hCD45⁺ Zellen, während die Milz nach Transfer von RA⁺ Treg-Zellen nur $4,7 \pm 1,1 \times 10^6$ hCD45⁺ Zellen enthielt und somit die Expansion humaner Zellen bis zu diesem Zeitpunkt um 76,5 % reduziert war. Der adoptive Transfer RA⁻ Treg-Zellen führte dagegen zu keiner signifikanten Reduktion humaner Zellen gegenüber der Kontrolle. RA⁺ Treg-Zellen supprimierten hierbei sowohl die Expansion humaner B-Zellen als auch die der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle war die Expansion der CD19⁺ Zellen um 88 %, die der CD4⁺ Zellen um 71,7 % und die der CD8⁺ T-Zellen um 44 % reduziert. An Tag 14 wurde eine Zunahme humaner Zellen in allen Behandlungsgruppen nachgewiesen (**Abb. 4-43B**). Nach adoptivem Transfer von RA⁻ Treg-Zellen stieg die Zahl humaner Zellen deutlich stärker an und die Milz enthielt mit $25 \pm 3 \times 10^6$ genauso viele hCD45⁺ Zellen wie die der Kontrolltiere ($24,3 \pm 3,7 \times 10^6$ hCD45⁺ Zellen). Nach Transfer von RA⁺ Treg-Zellen enthielt die Milz an Tag 14 nur $14 \pm 1 \times 10^6$ hCD45⁺ Zellen, so dass die Zellularität gegenüber der Kontrolle und der RA⁻ Treg-Gruppe mit 44 % noch immer signifikant reduziert war. Auch in diesem Experiment zeigte sich (unabhängig von der Behandlungsgruppe) die präferentielle Expansion von CD8⁺ Zellen ab Tag 10.

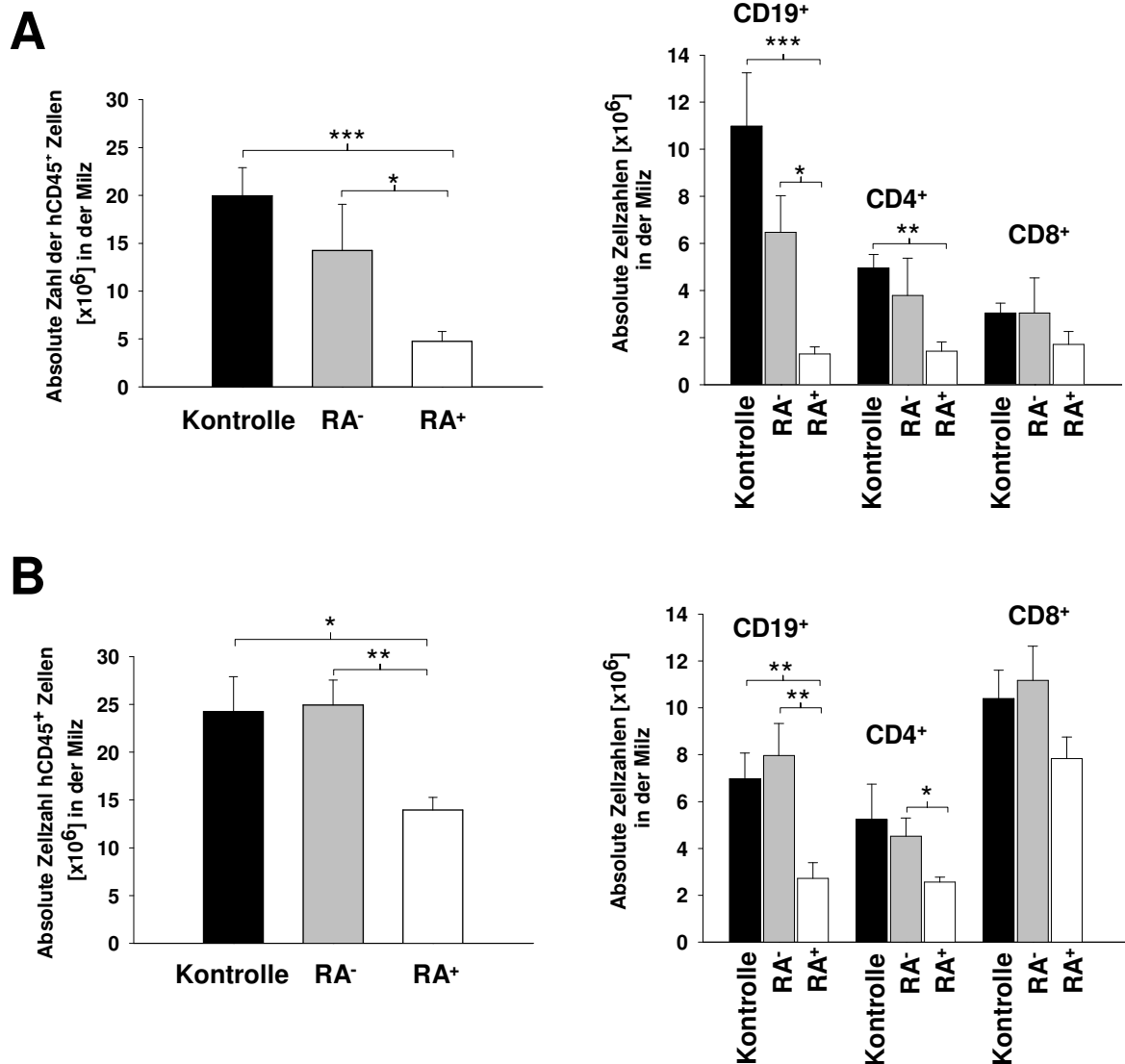


Abb. 4-43: Expansion humaner Zellen in der Milz 10 und 14 Tage nach Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs (Kontrolle) transplantiert. Je eine Behandlungsgruppe erhielt zusätzlich 10 x 10⁶ *in vitro* expandierte RA⁺ oder RA⁻ Treg-Zellen. Humane Zellen in der Milz als Gesamtzahl und absolute Zellzahlen für CD19⁺ B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an (A) d10 und (B) d14 nach xenogener Transplantation. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten (*n* = 9-12). Sterne kennzeichnen die Unterschiede (*student's t*-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01 und *** *p* < 0,001.

4.3.3.6 Einfluss *in vitro* expandierter Treg-Zellen auf die Zytokinproduktion humaner Zellen in der Frühphase nach xenogener Transplantation

Wie in der Literatur für murine CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen beschrieben und auch durch eigene Untersuchungen mit humanen natürlichen Treg-Zellen belegt, führt die Suppression durch Treg-Zellen nicht nur zur Einschränkung der Proliferation von Tkonv-Zellen, sondern verhindert auch deren Zytokinproduktion [143, 267]. Um zu überprüfen, ob der adoptive Transfer expandierter Treg-Subpopulationen die Zytokinproduktion von Tkonv-Zellen in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Empfängertieren beeinträchtigt, wurde die Zytokinproduktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* und *in vivo* analysiert. Für die Zytokinanalysen der Tkonv-Zellen *ex vivo* wurden Milzzellen 10 Tage nach Transplantation isoliert und mit PMA/Ionomycin *in vitro* restimuliert. Nach 5-stündiger Stimulierung wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre Produktion von IFNγ und IL-2 durchflusszytometrisch bestimmt.

Der adoptive Transfer expandierter RA⁺ Treg-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der IFNγ- und IL-2-Produktion der an Tag 10 reisolierten Tkonv-Zellen (**Abb. 4-44A**). Im Vergleich zur Kontrolle war die IL-2-Produktion in CD4⁺ Zellen um das 5,2-fache und die IFNγ-Produktion um das 5,3-fache reduziert. Die IFNγ-Produktion der CD8⁺ Zellen war gegenüber der Kontrolle um das 1,2-fache reduziert. Im Gegensatz dazu führte der adoptive Transfer RA⁻ Treg-Zellen zu keiner Beeinträchtigung der IFNγ- und IL-2-Produktion von Tkonv-Zellen.

Zur Untersuchung systemischer Zytokinspiegel wurde von den Tieren der Behandlungsgruppen 14, 21 und 28 Tage nach Transplantation Blut abgenommen und das Serum gewonnen. Die Analyse der Serumproben erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe des *cytometric bead array* (CBA). Der deutlichste Anstieg der mit der Expansion humaner Zellen verbundenen Zytokinproduktion wurde für IFNγ und IL-5 festgestellt (**Abb. 4-32**). Im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen wurde eine verminderte Produktion dieser Zytokine nach adoptivem Transfer expandierter RA⁺ Treg-Zellen beobachtet (**Abb. 4-44B**). Trotz der kontinuierlichen Zunahme der Zytokinspiegel mit fortschreitender Erkrankung der Tiere war die IFNγ-Produktion selbst 28 Tage nach Transplantation in Tieren, die RA⁺ Treg-Zellen erhalten hatten, noch um das 4,7-fache gegenüber der Kontrolle und um das 2,3-fache gegenüber der RA⁻ Treg-Gruppe vermindert. Auch für IL-5 ließen sich an Tag 28 noch deutlich niedrigere Serumspiegel in der mit RA⁺ Treg-Zellen behandelte Gruppe nachweisen.

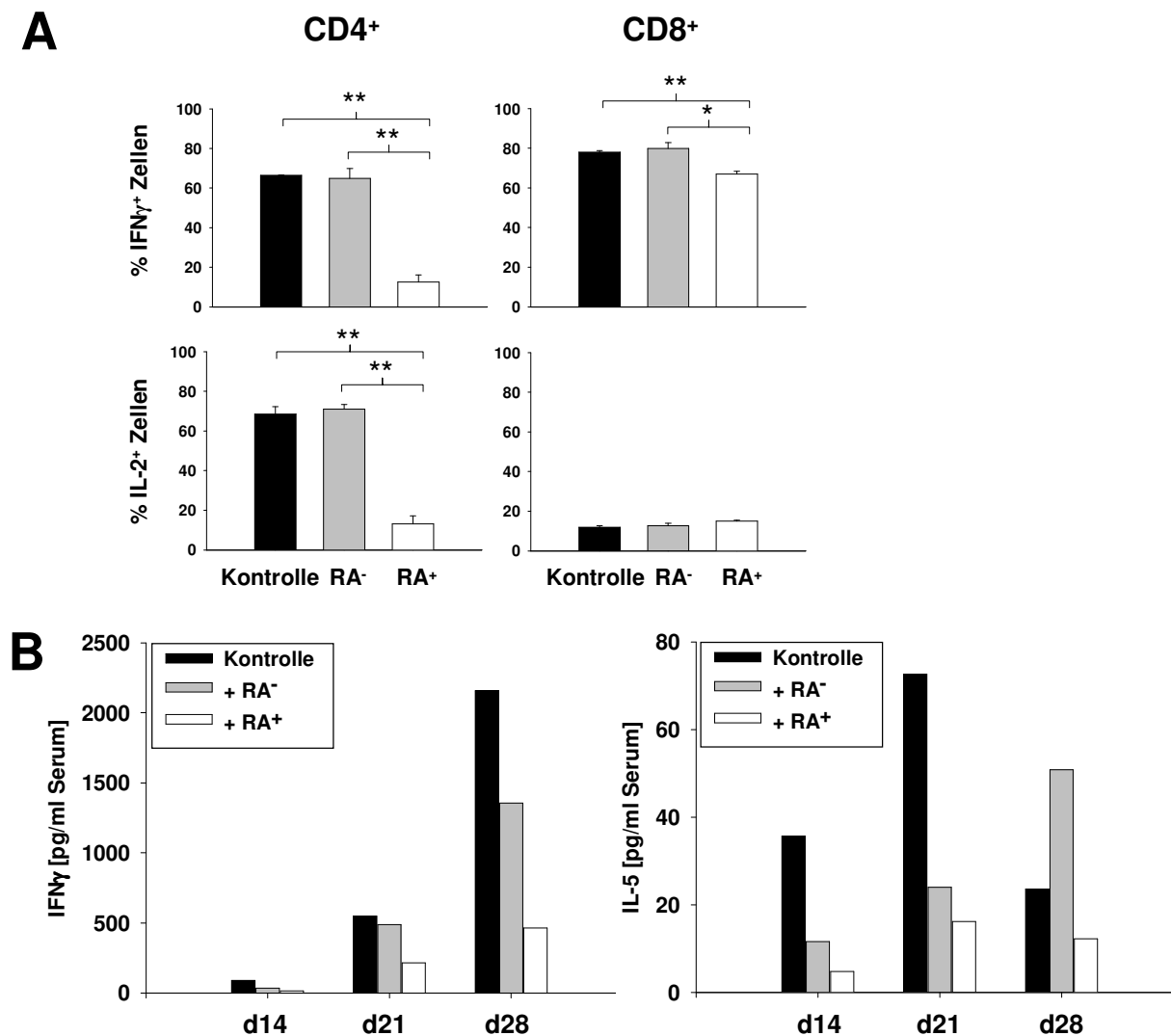


Abb. 4-44: Zytokinproduktion konventioneller T-Zellen nach Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen.

RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs (Kontrolle) transplantiert. Je eine Behandlungsgruppe erhielt zusätzlich 10 x 10⁶ *in vitro* expandierte RA⁺ oder RA⁻ Treg-Zellen. (A) Zehn Tage nach Transplantation wurden die Milzzellen der Behandlungsgruppen isoliert, mit PMA/Ionomycin *in vitro* 5 h stimuliert und die intrazelluläre Produktion von IFNγ und IL-2 durchflusszytometrisch bestimmt. (B) IFNγ- und IL-5-Gehalt im Serum 14, 21 und 28 Tage nach xenogener Transplantation. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus einem Experiment (*n* = 3 in (A)) und (*n* = 5 in (B)). Sterne kennzeichnen Unterschiede (*student's t*-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01 gegenüber der Kontrolle (hPBMCs).

4.3.3.7 Einfluss *in vitro* expandierter Treg-Zellen auf Organschäden in der Frühphase nach xenogener Transplantation

Im murinen Transplantationsmodell führt der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zu einer signifikanten Reduktion GvHD-assoziiierter Schäden in Zielorganen – insbesondere des Darms. Histologische Analysen von kranken Tiere nach xenogener Transplantation zeigten zumindest pathologische Veränderungen der Lunge und der Leber (**Abb. 4-33**). Da expandierte RA⁺ Treg-Zellen die Entwicklung der xenogenen Erkrankung jedenfalls

verzögerten, wurde als nächstes überprüft, ob dies mit geringeren histopathologischen Veränderungen einhergeht. Dazu wurden 10 und 14 Tage nach Transfer der *in vitro* expandierten Treg-Subpopulationen Lunge und Leber präpariert, Gewebsschnitte angefertigt und nach HE-Färbung anhand eines histologischen Scores beurteilt.

An Tag 10 und 14 nach xenogener Transplantation waren in der Lunge aller Behandlungsgruppen diskrete perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate nachweisbar, jedoch deutlich milder ausgeprägt als in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (s. **Abb. 4-33**). Eine Fibrosierung des Gewebes konnte zu diesem Zeitpunkt bei keinem der Tiere festgestellt werden. Der histologische Score der Leber aller untersuchten Tiere war an Tag 10 niedrig (**Abb. 4-45A**), stieg im Verlauf der nächsten vier Tage insbesondere in der Kontrollgruppe und in Tieren die RA⁻ Treg-Zellen erhalten hatten jedoch deutlich an (**Abb. 4-45B**). Histopathologisch zeigten sich lymphozytäre Infiltrate der Gallengänge, die mit Erweiterung von Periportalfeldern und vaskulärer Endothelitis einhergingen. Im Unterschied hierzu zeigten Tiere die RA⁺ Treg-Zellen erhalten hatten zwischen Tag 10 und 14 kaum einen Anstieg des Leberscores und histologisch keine Lymphozyteninfiltrate.

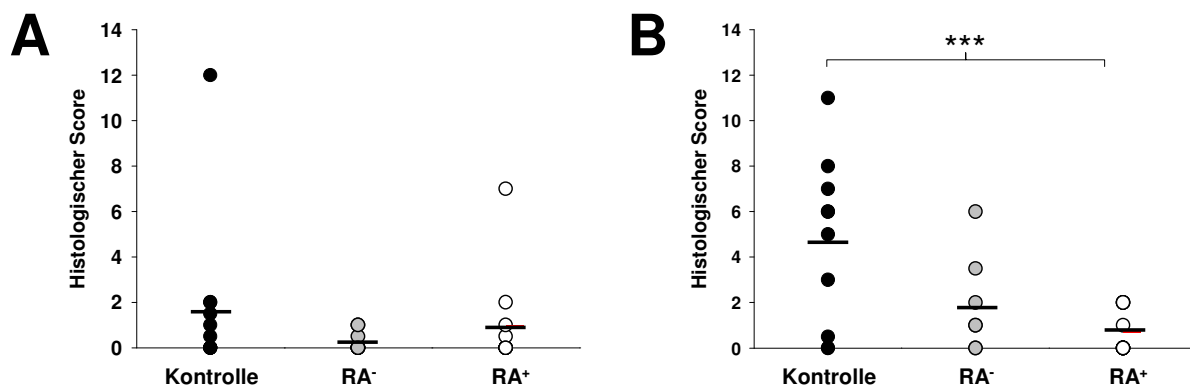


Abb. 4-45: Histologische Beurteilung der Leber nach Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen.

RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mäuse wurden subletal (3,5 Gy) bestrahlt und mit 20 x 10⁶ hPBMCs (Kontrolle) transplantiert und je eine Behandlungsgruppe erhielt zusätzlich 10 x 10⁶ *in vitro* expandierte RA⁺ bzw. RA⁻ Treg-Zellen. Histologische Beurteilung HE-gefärbter Gewebsschnitte der Leber (**A**) an Tag 10 und (**B**) Tag 14 nach xenogener Transplantation. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten ($n = 9-12$). Sterne kennzeichnen Unterschiede (Mann-Whitney-Test) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle (hPBMCs).

Diese Daten zeigten, dass RA⁺ Treg-Zellen zumindest in der Frühphase nach xenogener Transplantation suppressive Wirkung entfalten, die die Expansion und Effektorfunktion xenoreaktiver T-Zellen bremst und demzufolge die Pathologie an Zielorganen reduziert. Im Gegensatz dazu konnte nach Transfer von RA⁻ Treg-Zellen keine protektive Wirkung festgestellt werden, so dass trotz der Limitationen des Modellsystems die höhere Suppressionsaktivität expandierter RA⁺ Treg-Zellen auch *in vivo* bestätigt werden konnte.

5 Diskussion

Für den therapeutischen Erfolg der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) bei hämatologischen Neoplasien sind neben der Konditionierung vor allem reife Spender-T-Zellen des Transplantats verantwortlich. Sie fördern das Engraftment hämatopoetischer Zellen und somit die Rekonstitution der Spenderhämatopoese, vermitteln Immunität gegenüber opportunistischen Infektionen und haben antitumorale Wirkung (*graft versus leukemia*, GvL). Neben diesen gewünschten, heilsamen Effekten sind Spender-T-Zellen bedauerlicherweise auch Auslöser der GvHD, der Hauptursache für die hohe Morbidität und Mortalität nach allogener HSCT. Ein zentrales Ziel der Transplantationsforschung ist es daher, Therapiestrategien zu entwickeln, die das Risiko einer GvHD nach HSCT minimieren ohne dabei die heilsamen Effekte der Spender-T-Zellen abzuschwächen. Wie in der Literatur beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, schützt der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen im Mausmodell der allogenen KMT vor letaler GvHD [221, 224, 225]. Da humane natürliche Treg-Zellen murinen CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in ihrer immunregulatorischen Wirkung entsprechen, GvHD-Patienten eine reduzierte Zahl natürlicher Treg-Zellen aufweisen [231] und die Ausgangsfrequenz humaner Treg-Zellen des Spenders mit dem Schweregrad bzw. der Inzidenz der GvHD invers korrelieren [232], ist in Anlehnung an die tierexperimentellen Daten eine Wirkung adoptiv transferierter humaner natürlicher Treg-Zellen für die Prophylaxe oder Therapie der GvHD vorstellbar. Aufgrund der geringen Zahl humaner natürlicher Treg-Zellen im peripheren Blut (PB) ist ihre *in vitro* Expansion erforderlich, um ausreichende Zellzahlen für klinische Anwendungen zu erreichen. Im Fokus unserer Arbeitsgruppe steht die Entwicklung solcher Strategien zur Isolierung und Expansion humaner natürlicher Treg-Zellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war in diesem Zusammenhang die funktionelle und phänotypische Charakterisierung humaner natürlicher Treg-Zellen nach Expansion sowie die Evaluation *in vitro* expandierter Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell.

5.1 Charakterisierung *in vitro* expandierter humaner natürlicher Treg-Zellen

Die CD25⁺ Population humaner CD4⁺ T-Zellen im PB adulter Spender enthält im Gegensatz zu murinen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen neben natürlichen Treg-Zellen auch kürzlich aktivierte Effektorzellen und Gedächtniszellen, die sich durch eine intermediäre CD25-Expression auszeichnen [235, 268]. Humane natürliche Treg-Zellen hingegen sind vorwiegend in der CD25-hochexprimierenden (CD25^{high}) Population der CD4⁺ T-Zellen enthalten (**Abb. 4-14**). In Übereinstimmung mit der bis dahin verbreiteten Meinung, dass Foxp3/FOXP3 ein

linienspezifischer und funktionell relevanter Marker für natürliche Treg-Zellen ist [104-108], zeigte die FOXP3-Expressionsanalyse aus durchflusszytometrisch sortierten CD4⁺ Subpopulationen eine präferentielle Expression von FOXP3 in der CD25^{high} Population sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene. Daher schienen CD4⁺CD25^{high} T-Zellen als Ausgangspopulation für die *in vitro* Expansion humaner Treg-Zellen sehr gut geeignet.

Eine wichtige Voraussetzung für die therapeutische Anwendung *in vitro* expandierter Treg-Zellen ist der Erhalt ihrer funktionellen Eigenschaften nach Expansion und die Analyse der FOXP3-Expression stellte ein geeignetes Kriterium dar, um die Qualität der expandierten Treg-Population zu überprüfen. Zu Beginn dieser Arbeit war die Quantifizierung der FOXP3-Expression lediglich mit Hilfe der *real-time* PCR auf mRNA-Ebene möglich und erforderte die Ermittlung eines geeigneten Haushaltsgens, dessen Expressionslevel vor und nach Expansion weitgehend stabil bleibt. So zeigten klassische Haushaltsgene wie etwa GAPDH nach polyklonaler Aktivierung der T-Zell-Subpopulationen einen stimulationsabhängigen Anstieg des mRNA-Levels, so dass die Ausgangsexpression bis um das 20-fache übertriften wurde. Im Gegensatz dazu blieb die Expression der 18S rRNA in allen untersuchten Zellpopulationen auch nach Aktivierung und Proliferation der Zellen nahezu konstant. Diese Daten stimmen weitgehend mit den Ergebnissen von Bas und Kollegen überein, die in einer ähnlichen Studie zeigten, dass die Expression klassischer Haushaltsgene, wie β -Aktin und GAPDH in humanen mononukleären Zellen des PB (PBMCs) vor und nach Stimulation stark variieren [269]. Die basale Expression der 18S rRNA in CD4⁺ T-Zellen scheint daher ausreichend, um auch in Phasen gesteigerter Proteinsynthese genügend Ribosomen bereitstellen zu können. Die starke Zunahme der GAPDH mRNA-Expression lässt sich dadurch erklären, dass das PB eines gesunden Spenders zum Großteil naive Lymphozyten enthält, die sich in einem ruhenden Zustand - der G₀-Phase des Zellzyklus – befinden. Erst nach Antigenstimulation gelangen sie in die G₁-Phase, in der die biosynthetische Aktivität der Zellen stark zunimmt. Die Expressionsdaten sprechen dafür, dass unter diesen Bedingungen aufgrund des erhöhten Energiebedarfs vermehrt Glykolyse betrieben und daher auch verstärkt *gapdh* transkribiert wird. Die Normalisierung der *real-time* PCR-Daten ist eine wichtige Voraussetzung zur Generierung biologisch relevanter Daten [270] und, wie gezeigt wurde, ist die Validierung des Haushaltsgens für die jeweiligen experimentellen Bedingungen von entscheidender Bedeutung.

Die Quantifizierung der FOXP3 mRNA-Expression in den CD4⁺ Subpopulationen vor und nach Expansion zeigte, dass im Kulturverlauf zu jedem untersuchten Zeitpunkt der mRNA-Level in der CD4⁺CD25^{high} Treg-Population am höchsten war. Darüber hinaus behielten CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen auch 3 Wochen nach Expansion die hohe FOXP3 mRNA-Expression der frisch sortierten Treg-Zellen bei. Die präferentielle Expression von FOXP3 in der CD25^{high} Treg-Population vor und nach Expansion ließ sich auf Proteinebene verifizieren.

Die funktionellen Eigenschaften *in vitro* expandierter CD4⁺CD25 Subpopulationen wurden mit Hilfe eines Suppressions-Assays analysiert, wobei Tkonv-Zellen zur Bestimmung der proliferativen Kapazität mit CFSE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) markiert wurden. Die Verwendung von CFSE hatte gegenüber dem klassischen Proliferationsassay mit ³H-Thymidin entscheidende Vorteile. Als durchflusszytometrische Methode ermöglicht der CFSE-Test zum einen eine parallele Färbung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern, wodurch einzelne Populationen getrennt voneinander analysiert werden können und zum anderen kann die Proliferation der Zellen auf diese Art über mehrere Tage verfolgt werden. *In vitro* expandierte CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen zeigten stark suppressive Eigenschaften, während weder expandierte CD4⁺CD25^{int} noch CD4⁺CD25^{neg} Zellen die Proliferation von Tkonv-Zellen signifikant beeinflussten. Somit konnte gezeigt werden, dass die CD4⁺CD25^{high} Treg-Population auch nach *in vitro* Expansion ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften beibehalten, was das Konzept des klinischen Einsatzes *in vitro* expandierter CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen stützt.

Die Expression des Chemokinrezeptor 7 (CCR7) sowie des Zelladhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) ermöglichen T-Zellen ein effizientes *homing* in lymphatische Organe und die Koexpression dieser Rezeptoren auf Treg-Zellen erwies sich als wichtige Voraussetzung für deren protektive Wirkung im Mausmodell der GvHD [223, 252, 253]. In Zusammenarbeit mit Laborkollegen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Großteil der *in vitro* expandierten CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen selbst nach dreiwöchiger Expansion die Expression von CCR7 und CD62L beibehielten, während dies bei expandierten CD4⁺CD25^{int} bzw. CD4⁺CD25^{neg} Zellen nicht der Fall war. Unter Zuhilfenahme zwischenzeitlich kommerziell erhältlicher FOXP3-spezifischer Antikörper für die Durchflusszytometrie [257] konnte festgestellt werden, dass innerhalb der CD25^{high} Treg-Population eben diese CD62L⁺CCR7⁺ Subpopulation (high⁺⁺) eine einheitliche und stabile FOXP3-Expression aufwies. Sie schien also eine reine Treg-Population darzustellen – frei von kontaminierenden FOXP3⁻ Effektorzellen – und demzufolge besser für klinische Anwendungen geeignet. Die Isolierung von CCR7⁺CD62L⁺CD4⁺CD25^{high} Zellen direkt aus Leukapheresaten lieferte nach Expansion jedoch keine phänotypisch und funktionell stabile Treg-Population. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Koexpression von CCR7 und CD62L sowohl auf naiven T-Zellen als auch auf einer Subpopulation antigenerfahrener T-Zellen darstellen, den so genannten *central memory* (CM) T-Zellen [258]. Beide Zellpopulationen können jedoch anhand der Expression der CD45-Isoformen RA und RO unterschieden werden. Durch zusätzliche Färbungen für CD45RA konnten wir so antigenerfahrene (CD45RA⁻) von naiven (CD45RA⁺) Treg-Zellen unterscheiden und zeigen, dass nur naive Treg-Zellen auch nach dreiwöchiger Expansion einen homogenen Treg-Phänotyp (CCR7⁺CD62L⁺FOXP3⁺) aufweisen (**Abb. 4-24**), während antigenerfahrene Treg-Zellen bereits nach 7 Tagen Expansion eine heterogene

Expression von CCR7, CD62L und FOXP3 zeigen. Dies war auch insofern erstaunlich, als bis dahin die Meinung vertreten wurde, dass $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen im PB adulter Menschen ausschließlich im Pool antigenerfahrener $CD45RO^+$ Zellen zu finden seien [229, 230, 266, 268, 271]. Lediglich zwei andere Arbeitsgruppen zeigten zeitgleich, dass auch bei Erwachsenen naive Treg-Zellen im PB nachweisbar sind [272, 273]. Diese RA^+ Treg-Population zeigte sowohl vor als auch nach *in vitro* Expansion im funktionellen Assay eine starke suppressive Aktivität, während die Suppression durch *in vitro* expandierte RA^- Treg-Zellen vergleichsweise gering ausfiel.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Population im PB adulter Spender eine heterogene Population aus naiven und antigenerfahrenen Treg-Zellen darstellt. Diese Treg-Subpopulationen wiesen nicht nur eine differente Expression der Lymphknoten-*homing*-Rezeptoren CCR7 und CD62L auf, sondern zeigten nach repetitiver Stimulation eindeutige Unterschiede in der FOXP3-Expression und immunregulatorischen Funktion, da nach Expansion nur naive Treg-Zellen ihre FOXP3 Expression homogen beibehielten und die Proliferation konventioneller T-Zellen *in vitro* effizient supprimierten.

Interessanterweise konnte im Kulturverlauf auch in der $CD4^+CD25^{neg}$ Subpopulation eine geringe Induktion der FOXP3-Expression nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stand zum damaligen Zeitpunkt ganz im Gegensatz zu den bis dahin publizierten Arbeiten in der Maus, die zeigten, dass sich die *Foxp3*-Expression in Tkonv-Zellen nach Aktivierung nicht induzieren lässt [104, 109]. Nachdem viele der charakteristischen Treg-Moleküle auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert werden, wurde *Foxp3* deshalb als spezifischer Marker für die $CD4^+CD25^+$ Treg-Linie erachtet. Jedoch zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FOXP3-Expressionsanalysen konventioneller T-Zellen, dass sich sowohl in $CD4^+$ als auch in $CD8^+$ Tkonv-Zellen nach polyklonaler Stimulation die Expression des FOXP3-Gens induzieren lässt. Diese nimmt nach Entfernung des Stimulus allerdings rasch wieder auf kaum detektierbare Werte ab. Ähnliche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigen diese transiente Expression von FOXP3 nach polyklonaler Stimulation humaner Tkonv-Zellen sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene [237, 274-276]. Eine vergleichende Analyse dieser induzierten FOXP3 mRNA-Expression mit der konstanten Expression in naiven $CD4^+CD25^{high}$ Treg-Zellen zeigte jedoch, dass das FOXP3 mRNA-Level der stimulierten Tkonv-Zellen selbst zum Zeitpunkt der maximalen Expression deutlich niedriger lag als in natürlichen Treg-Zellen. Eine Überexpression von *Foxp3* in murinen Tkonv-Zellen bewirkt zwar ihre Konversion in Zellen mit regulatorischem Phänotyp und suppressiver Funktion [109], inwieweit wiederum die transiente Induktion von FOXP3 in humanen Tkonv-Zellen stabil suppressive Eigenschaften hervorruft, wird derzeit kontrovers diskutiert. Einige Gruppen beobachteten suppressive Aktivität nach Induktion von FOXP3

[237, 277], während wiederum zahlreiche andere Studien nahe legen, dass die transiente FOXP3-Expression in humanen T-Zellen nicht zwingend mit der suppressiven Kapazität korreliert [274, 276, 278]. Im Rahmen dieser Arbeit fiel bei der Untersuchung der FOXP3-Expression der diversen expandierten T-Zell-Subpopulationen auf, dass der FOXP3 mRNA-Level bzw. Proteinlevel mit der suppressiven Aktivität natürlicher Treg-Zellen in aller Regel gut korreliert. So zeigten $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen nach zweiwöchiger Expansion mit einer im Vergleich zu RA^- Treg-Zellen erhöhten FOXP3-Expression stärkere suppressive Aktivität, während RA^+ Treg-Zellen mit der stabilsten und höchsten FOXP3-Expression den wirkungsvollsten suppressiven Effekt erzielten. Im Unterschied hierzu konnte für *in vitro* expandierte $CD4^+CD25^{int}$ T-Zellen, die im Vergleich zu $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen eine leicht erhöhte FOXP3-Expression aufwiesen, nur tendenziell suppressive Aktivität nachgewiesen werden. Daraus könnte gefolgert werden, dass erst ab einem gewissen FOXP3-Expressionslevel und/oder ausreichender Expressionsdauer regulatorische Funktionen induziert werden. Dafür sprechen die Ergebnisse einer Studie von Allan und Kollegen, die nach Transduktion einer konditional aktiven Form des FOXP3-Gens, unterschiedliche Mengen des FOXP3 Proteins in Tkonv-Zellen exprimieren konnten. Dabei zeigte sich, dass Tkonv-Zellen erst ab einer stark erhöhten FOXP3-Expression suppressive Kapazität erlangen [279]. Ähnlich wurde kürzlich in einem murinen Transplantationsmodell nachgewiesen, dass der Foxp3-Expressionslevel von $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen direkt mit ihrer Kapazität korreliert, alloreaktive T-Zellen *in vivo* zu supprimieren [280]. Eine stabile und hohe Expression von FOXP3/Foxp3 scheint daher eine wichtige Voraussetzung zu sein, um suppressive Eigenschaften in natürlichen Treg-Zellen zu induzieren und kontinuierlich aufrecht zu erhalten.

Die Regulation der FOXP3-Expression steht derzeit im Fokus intensiver Forschung. Zahlreiche Studien über murine und humane natürliche Treg-Zellen beschreiben, dass die durch TCR-Ligation erzeugten Signalwege zur Induktion von Foxp3/FOXP3 beitragen [275, 281, 282]. Neben den TCR-vermittelten Signalen spielen auch kostimulatorische Signalwege über CD28 [283], IL-2 und über andere Zytokine vermittelte Signale [172] eine Rolle. In Übereinstimmung hiermit führte die polyklonale Aktivierung (über CD3/CD28 mit exogenem IL-2) von $CD4^+CD25^{high}$ bzw. RA^+ Treg-Zellen während der *in vitro* Expansion zu einer gesteigerten FOXP3-Transkription, wobei sich diese nach Absetzen des Stimulus wieder auf das anfängliche Expressionslevel normalisierte. Obwohl solche Signale an der Regulation der FOXP3-Expression beteiligt zu sein scheinen, ist die Regulation der FOXP3-Expression unter physiologischen Bedingungen noch unklar. Interessant ist insbesondere die Frage, welche molekularen Regulationsmechanismen zur stabilen FOXP3 Expression in sich entwickelnden Treg-Zellen im Thymus führen und wie sich diese von denen induzierter Treg-Zellen in der Peripherie unterscheiden. Erste Erklärungen lieferten Untersuchungen mit

murinen Zellen, in denen gezeigt wurde, dass epigenetische Veränderungen des Foxp3-Genlokus für die Stabilität der Expression von großer Bedeutung sind. So fanden Floess und Kollegen in einer hochkonservierten CpG-reichen Region des murinen Foxp3-Gens bemerkenswerte Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen Tkonv-Zellen und natürlichen CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen [284]. Diese Region ist in CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen komplett demethyliert, während sie in Tkonv-Zellen vollständig methyliert vorliegt. Daher wurde sie als Treg-Zell-spezifische demethylierte Region (*Treg-specific demethylated region*, TSDR) bezeichnet. *In vitro* Analysen, in denen die transkriptionelle Aktivität nach Methylierung dieser Region stark reduziert wurde, bestätigen, dass die TSDR über Enhancer-Aktivität verfügt [285]. Im Rahmen der Studie von Floess und Kollegen konnte nachgewiesen werden, dass in TGFβ-induzierten CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen, die trotz hoher Expression von Foxp3 keinen stabilen Treg-Phänotyp entwickelten, die TSDR nur schwach oder gar nicht demethyliert war [284]. Insofern scheint die Foxp3-Expression in murinen CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen durch epigenetische Modifikationen stabilisiert zu werden, wobei die Demethylierung der TSDR die Entwicklung zu einer permanenten, suppressiven natürlichen Treg-Zelle ermöglicht.

Wichtige Befunde für die epigenetische Regulation von FOXP3 in humanen natürlichen Treg-Zellen lieferte die Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Jochen Huehn (Charité, Berlin), in deren Rahmen die Methylierung des FOXP3-Genlokus *in vitro* expandierter RA⁺ und RA⁻Treg-Zellen untersucht wurde [286]. Die CpG-reiche TSDR-Region ist bei Säugetieren hochkonserviert und demzufolge differenziert wie bei der Maus auch beim Menschen der Methylierungsstatus der TSDR zwischen natürlichen Treg-Zellen und Tkonv-Zellen oder peripher induzierten Treg-Zellen. Im Einklang mit ihrem stabilen FOXP3⁺ Phänotyp zeigten *in vitro* expandierte RA⁺ Treg-Zellen eine vollständig demethylierte TSDR [286]. Im Gegensatz dazu war die TSDR *in vitro* expandierter CD4⁺CD25^{neg} Zellen vollends methyliert, was mit der fehlenden FOXP3-Expression in dieser Zellpopulation korellierte. Analysen des Methylierungsmusters von polyklonal aktivierten bzw. TGFβ-induzierten FOXP3⁺ Tkonv-Zellen ergaben eine vollständige Methylierung ihrer TSDR. Diese Beobachtungen lieferten einen weiteren Beweis dafür, dass nur eine Demethylierung der TSDR mit der Entwicklung von stabilen natürlichen FOXP3⁺ Treg-Zellen verbunden ist. Interessanterweise waren die CpGs der TSDR von frisch isolierten RA⁻ Treg-Zellen komplett demethyliert, nach *in vitro* Expansion allerdings mit einer Methylierungsrate zwischen 30-60 % zum Teil methyliert, so dass von einem Verlust ihrer Treg-Zell-Eigenschaften nach repetitiver *in vitro* Stimulation ausgegangen werden musste (s. Anhang **Abb. 8-1**). Diese Beobachtungen deckten sich mit der reduzierten FOXP3-Expression expandierter RA⁻ Treg-Zellen sowie ihrer verminderten Suppressionskapazität. Da bisher angenommen wurde, dass humane natürliche Treg-Zellen vor allem in der antigenerfahrenen Population enthalten sind,

war die Beobachtung, dass RA⁻ Treg-Zellen ihre Treg-charakteristischen Eigenschaften nach Expansion verlieren, sehr überraschend. Obwohl RA⁻ Treg-Zellen nach Zellsortierung fast ausschließlich FOXP3⁺ waren, behielt nur ein Bruchteil dieser Population nach dreiwöchiger Expansion die Expression von FOXP3 bei. Dieser Befund erklärte auch die phänotypische Heterogenität der gesamten CD4⁺CD25^{high} Treg-Population nach längerer Expansion. Der Verlust funktioneller und phänotypischer Treg-Eigenschaften nach Expansion der RA⁻ Treg-Zellen könnte auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Einerseits könnte eine Verunreinigung der Ausgangspopulation mit CD25⁺ Tkonv-Zellen und deren präferentielle Expansion die FOXP3⁺ RA⁻ Treg-Zellen aus der Kultur verdrängen. Darüber hinaus wäre eine Kontamination der frisch sortierten RA⁻ Treg-Population mit peripher induzierten Treg-Zellen vorstellbar, die FOXP3 nur transient exprimieren und während der Expansion verlieren. Alternativ könnte die repetitive Stimulierung antigenerfahrener RA⁻ Treg-Zellen zu einer Herabregulation der FOXP3-Expression führen, was zum Verlust der suppressiven Aktivität natürlicher Treg-Zellen beitragen könnte. Neben den oben genannten Methylierungsanalysen frisch isolierter RA⁻ Treg-Populationen, die eine Kontamination mit demethylierten Tkonv-Zellen oder peripher induzierten Treg-Zellen weitgehend ausschließen, konnten wir durch Klonierungsexperimente schließlich eindeutig nachweisen, dass auch natürliche Treg-Zellen nach repetitiver Stimulation und Langzeitkultivierung ihre TSDR methylieren und FOXP3 verlieren können [287]. Daher ist anzunehmen, dass antigenerfahrene Treg-Zellen vor Isolierung mehrere TCR-Stimulationszyklen *in vivo* durchlaufen haben, während RA⁺ Treg-Zellen erst kürzlich den Thymus verlassen haben und keinen Antigenkontakt in der Peripherie hatten. Inwieweit diese Plastizität der Treg-Zellen auf *in vitro* Kulturbedingungen zurückzuführen ist oder dies eine Entwicklungsstufe auch unter physiologischen Bedingungen darstellt, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

Die Erkenntnis, dass naive Treg-Zellen des PB adulter Menschen nach Expansion ihre charakteristischen Eigenschaften aufrechterhalten wurde mittlerweile von Arbeitsgruppen bestätigt, die humane Treg-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert und expandiert haben [288-290]. Nabelschnurblut enthält viele naive CD45RA⁺ Treg-Zellen und würde daher eine attraktive Quelle zur Gewinnung dieser Zellen für therapeutische Ansätze darstellen. Allerdings ist die Verfügbarkeit HLA-geeigneter Nabelschnurblutpräparate für Transplantationspatienten im Vergleich zu Stammzellpräparaten aus dem PB adulter Spender eher gering [291] und die Anzahl hämatopoetischer Stammzellen eines Nabelschnurpräparates für die Transplantation eines Erwachsenen häufig nicht ausreichend, woraus ein erhöhtes Risiko des Transplantatversagens resultiert [292]. Unter der Voraussetzung, dass für therapeutische Strategien zur Prävention der GvHD nach allogener HSCT natürliche Treg-Zellen des gleichen Spenders transferiert werden sollten, scheinen Nabelschnurpräparate aufgrund der geringen Zellzahl nur bedingt für klinische

Anwendungen geeignet. Daher stellt die Expansion von naiven natürlichen Treg-Zellen aus dem PB adulter Menschen eine vielversprechende Strategie für die Prophylaxe und/oder Therapie der GvHD des Menschen dar.

Bei RA⁺ Treg-Zellen handelt es sich vornehmlich um kürzlich aus dem Thymus exportierte Zellen, deren Zahl im PB des Menschen mit zunehmendem Alter (und der damit verbundenen Thymusinvolution) abnimmt [272, 273]. Für die Therapie der GvHD nach allogener HSCT wäre dies nicht zwangsweise ein Hindernis, da hier in der Regel Stammzellen und Treg-Zellen von gesunden und meist jungen Spenders gewonnen werden. Die Übertragung solcher Therapiestrategien auf Patienten mit Autoimmunerkrankungen würde dagegen eine große Herausforderung darstellen, da hierfür autologe Treg-Zellen gewonnen werden müssten und viele dieser Erkrankungen *per se* mit einer Reduktion natürlicher Treg-Zellen in der Peripherie einhergehen [190, 191, 194].

Eine wichtige Voraussetzung für den klinischen Einsatz von humanen natürlichen Treg-Zellen stellt ihre Isolierung unter den für klinische Anwendungen erforderlichen GMP-Bedingungen (*good manufacturing practice*, GMP) dar. So ermöglicht die durchflusszytometrische Zellsortierung zwar eine Aufreinigung dieser Zellpopulation mit einer Reinheit von mehr als 98 %, wodurch die Kontaminationen mit unerwünschten Zellen nahezu vollständig ausgeschlossen werden kann, diese ist jedoch bislang noch nicht GMP-konform durchführbar. Die in der EU geltenden GMP-Richtlinien erlauben bisher eine Anreicherung klinischer Zellpräparate nur mit Hilfe der immunomagnetischen Zellseparation (MACS), die weitgehend in einem geschlossenen System erfolgt. Die MACS-Technik selektioniert mittels Antikörper-gekoppelter immunomagnetischer Metallpartikel und ermöglicht so eine Positiv- und/oder Negativselektion von Zellen. Die gezielte Isolierung der CD4⁺CD25^{high} Treg-Population unter humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen ist daher mit dieser Methode nicht realisierbar, obwohl unsere Arbeitsgruppe ein Protokoll entwickelt hat, das über repetitive Selektionsschritte eine Anreicherung von CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen aus Leukapheresaten auf mindestens 50 % ermöglicht [236]. Diese Treg-Zellpräparate werden zur Zeit in einer klinischen Phase-I-Studie eingesetzt (Prof. Dr. Edinger, unveröffentlichte Daten). Die Isolierung naiver Treg-Zellen unter GMP-Bedingungen mit Hilfe der MACS-Technik erfordert weitere Separationsschritte und wird derzeit in Kooperation mit der Firma Miltenyi Biotec GmbH in unserer Arbeitsgruppe entwickelt.

Phänotypische und funktionelle *in vitro* Analysen der expandierten humanen Treg-Subpopulationen lassen eine therapeutische Wirksamkeit der naiven Treg-Zellen vermuten, jedoch fehlen diesen Untersuchungssystemen zum einen die Komplexität des lebenden Organismus und zum anderen die pathophysiologischen Komponenten der GvHD. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurde daher auf ein xenogenes Transplantationsmodell

zurückgegriffen, bei dem der intravenöse Transfer von humanen PBMCs in immundefiziente RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse zu einer letalen Erkrankung führt, die der GvHD im Menschen ähnlich sein soll [234]. Ausgehend von der Idee, dass diese xenogene GvHD (xGvHD) ein geeignetes präklinisches Modell zur Untersuchung potentieller Therapiestrategien der GvHD im Menschen darstellen könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, inwieweit expandierte humane Treg-Zellen in der Lage sind xenoreaktive humane T-Zellen *in vivo* zu supprimieren und die so genannte xGvHD zu kontrollieren.

5.2 Mausmodell der akuten GvHD

Um die Entwicklung der xenogenen Erkrankung sowie die Effekte adoptiv transferierter expandierter humaner Treg-Zellen in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen besser beurteilen zu können, wurde zunächst ein rein murines GvHD-Modell (**Abb. 4-1**) etabliert und darin der Effekt des adoptiven Transfers muriner CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen untersucht. In diesem Modell führte der Transfer MHC-differenten CD4⁺ Tkonv-Zellen zur Ausbildung der akuten GvH-Erkrankung. Mit zunehmend stärker werdenden klinischen Symptomen führte die akute GvHD ab Tag 40 zu einer erhöhten Mortalitätsrate, wobei alle Tiere innerhalb von 100 Tagen an den Folgen der Erkrankung verstarben. Das klinische Bild äußerte sich in einer verminderten Aktivität, verstärkter Kyphose, struppigem Fell, Schuppungen der Haut mit zum Teil massiven erythematösen Veränderungen sowie raschem Gewichtsverlust und starker Diarrhö. Die histopathologische Beurteilung des Gewebes wies Veränderungen der Haut, der Leber und des Darms nach. Diese Befunde stehen im Einklang mit der beschriebenen Pathologie der akuten GvHD des Menschen [250], wobei der Darm allerdings das zentrale und fatale Zielorgan darstellt. Auch in den GvHD-Tieren zeigten die Biopsien des Kolons massive lymphozytäre Infiltrate und eine Zerstörung der Gewebearchitektur, was den rapiden Gewichtsverlust und die auftretende Diarrhö im Verlauf der akuten GvHD erklärt.

Neben den klassischen Zielorganen Haut, Leber und Darm wird im Rahmen der akuten GvHD auch das lymphatische System angegriffen. So kam es in GvHD-Tieren zwar zu einer normalen Regeneration des myeloiden Kompartiments, die Rekonstitution des lymphatischen Zellkompartiments war jedoch deutlich beeinträchtigt. Dabei war die absolute Anzahl der B-Zellen in KM und Milz sowie der T-Zellen in der Milz um mehr als 95 % reduziert. Eine Ursache hierfür ist die Sensitivität des lymphatischen Gewebes gegenüber alloreaktiven T-Zellen, wodurch die Neubildung und das Einnisten neu gebildeter Lymphozyten beeinträchtigt wird. Tatsächlich wurde in Mausmodellen der akuten GvHD eine Schädigung des Thymus und sekundärer Lymphorgane beobachtet. Dabei wandern reife Spender-T-Zellen in den Thymus, induzieren nach allogener Aktivierung Apoptose in TECs und führen durch die Schädigung des für die Thymopoese essentiellen Stromas zu einer Störung der Thymozyten-Reifung [293]. Darüber hinaus zeigen Histologien von Milzen und

Lymphknoten von GvHD-Tieren eine Atrophie und Fibrosierung des Gewebes (eigene Beobachtungen [294, 295]), die mit einer reduzierten Zahl von B- und T-Lymphozyten einhergeht. Auch beim Menschen führt die GvHD zu einer gestörten Rekonstitution von B- und T-Zellen [296, 297]. Aufgrund dieser Immundefizienz sind GvHD-Patienten vermehrt dem Risiko von bakteriellen, viralen oder mykotischen Infektionen ausgesetzt. In Übereinstimmung mit Beobachtungen in der Maus bewirkt die akute GvHD des Menschen Veränderungen im Thymusgewebe mit Schädigungen insbesondere des Stromas, welche zu einer defekten Thymopoese und damit letztendlich zu einem verminderten thymischen Export reifer T-Zellen führen [298]. Für die Defizienz der B-Zellen während GvHD wird ähnlich wie bei T-Zellen eine Störung der B-Zell-Reifung vermutet. CD19 ist das früheste Differenzierungsantigen der B-Zelllinie und wird schon auf Pro-B-Zellen exprimiert [299]. Die Beobachtung, dass im KM der GvHD-Tiere fast keine CD19⁺ Zellen detektiert werden konnten, liefert erste Hinweise für Defekte in der B-Lymphopoese. Mögliche Ursachen für die gestörte B-Zellentwicklung während der GvHD könnten entweder inhibitorische Zytokine, wie IFN γ oder IL-1 sein, die durch aktivierte Zellen in der Effektorphase der GvHD gebildet werden, oder aber eine direkte Alloreaktivität der Spender-T-Zellen gegen das KM-Stroma. Welche Mechanismen der gestörten T- und B-Zellrekonstitution während der akuten GvHD zugrunde liegen, bedarf weiterer Untersuchungen. Diese könnten dazu beitragen neue Strategien zu entwickeln, um die Immunrekonstitution nach allogener HSCT zu verbessern und dadurch das Risiko opportunistischer Infektionen zu minimieren.

Ausführliche Studien unserer Arbeitsgruppe und einiger anderer Gruppen zeigten, dass adoptiv transferierte Spender-Treg-Zellen die GvHD im murinen Modell der allogenen KMT verhindern oder abschwächen und dadurch die GvHD-Mortalität reduzieren [221, 224, 225]. Erwartungsgemäß führte ebenfalls in dem hier verwendeten Modell der adoptive Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zu einem Schutz der Empfängertiere vor GvHD, so dass mehr als 75 % der Tiere die ansonsten letale Dosis von $2,5 \times 10^5$ Tkonv-Zellen überlebten. Obwohl auch Tiere, die mit Tkonv- und Treg-Zellen kotransplantiert wurden, zunächst klinische Zeichen der GvHD zeigten, waren diese deutlich milder ausgeprägt und über den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen reversibel. In Übereinstimmung damit konnte in diesen Tieren eine beträchtliche Reduktion der lymphozytären Infiltrate und damit einhergehend deutlich verminderte pathologische Veränderungen der Haut, Leber und insbesondere des Darms nachgewiesen werden.

Für die Pathophysiologie der akuten GvHD ist die fulminante Expansion alloreaktiver T-Zellen während der Aktivierungsphase charakteristisch, die durch das proinflammatorische Milieu und aktivierte Empfänger-APCs nach Konditionierung hervorgerufen wird [215, 260]. Die eigentliche Erkrankung wird dann durch die Differenzierung aktivierter Spender-T-Zellen in Effektorzellen, deren Migration in Zielorgane sowie deren zytotoxische Aktivität ausgelöst.

Mit Hilfe der Biolumineszenz Abbildungs-Technik (*bioluminescence imaging*, BLI) war es möglich Luziferase-exprimierende (Luc^+) Tkonv-Zellen nach allogener KMT *in vivo* zu verfolgen [300]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Tkonv-Zellen früh nach Transplantation sekundäre Lymphorgane und GvHD-Zielorgane (Leber, Darm und Haut) infiltrieren. Nach adoptivem Transfer natürlicher Treg-Zellen zeigen Tkonv-Zellen ein ähnliches Verteilungsmuster, jedoch war ihre Expansion stark reduziert [222]. Quantitative Analysen wiesen dabei eine Reduktion von Tkonv-Zellen $> 65\%$ in Lymphknoten, Milz und Leber nach. Die Expression von *homing*-Rezeptoren für lymphatische Organe ist eine wichtige Voraussetzung für die suppressive Effektivität muriner Treg-Zellen, da nur CD62L^+ Treg-Zellen vor GvHD schützen können [223]. Insofern scheint die Migration von natürlichen Treg-Zellen in sekundäre Lymphorgane – den Orten des *primings* alloreaktiver T-Zellen – für den Schutz vor GvHD von großer Bedeutung. Die histologische Beurteilung klassischer GvHD-Organen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab bei vor GvHD geschützten Tieren nur minimale lymphozytäre Infiltrate der Leber und des Darms, die jedoch keine Schäden des Gewebes hervorriefen. Daraus könnte gefolgert werden, dass die suppressive Aktivität von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen in sekundären Lymphorganen die Expansion alloreaktiver T-Zellen verhindert und damit die anschließende Infiltration von Zielorganen unterbindet. Eigene durchflusszytometrische Analysen diverser Organe (Milz, Lymphknoten und Leber) zeigen darüber hinaus jedoch eine Kolokalisation von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg- und Tkonv-Zellen in diesen Geweben. Diese Beobachtungen wurden in einer aktuellen Studie von Nguyen und Kollegen bestätigt, die Luc^+ Treg-Zellen nach adoptivem Transfer im allogenen KMT-Modell anhand BLI *in vivo* verfolgten [301]. Adoptiv transferierte $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen migrierten hier ähnlich wie Tkonv-Zellen zunächst in sekundäre lymphatische Organe (in zervikale und periphere Lymphknoten sowie in die Milz), proliferierten dort und wanderten im Anschluss in die peripheren Zielorgane (Leber, Darm und Haut) aus. Dabei hemmten sie die Proliferation von Luc^+ Tkonv-Zellen sowohl in sekundären Lymphorganen als auch in GvHD-Organen. Daraus kann geschlossen werden, dass $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen nach Aktivierung ihre Effektorfunktion sowohl in lymphatischen Organen als auch in GvHD Zielorganen ausüben, wobei die Hemmung der frühen Expansion von Tkonv-Zellen in sekundären Lymphorganen den zentralen Mechanismus des protektiven Effekts nach adoptivem Transfer darstellt.

Der protektive Effekt adoptiv transferierter Treg-Zellen wirkte sich zudem positiv auf die Immunrekonstitution nach allogener KMT aus. Die Transplantation von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen ohne GvHD-induzierende Tkonv-Zellen führte zur Rekonstitution von Lymphozyten und myeloischen Zellen, die mit dem hämatopoetischen Entwicklungsmuster der KM-Kontrollen vergleichbar war. Tiere, die mit Tkonv-Zellen und $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen kotransplantiert wurden, zeigten zu Zeitpunkten, an denen sie klinische Anzeichen der GvHD entwickelten, eine reduzierte Lymphozytenfrequenz im PB, die sich jedoch im weiteren

Zeitverlauf mit dem Abklingen der Symptome normalisierte. Darüber hinaus zeigten quantitative Analysen von B- und T-Lymphozyten im KM und in der Milz eine intakte Rekonstitution des lymphatischen Zellkompartimentes nach adoptivem Transfer $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in anderen Mausmodellen der allogenen KMT gefunden [226, 228]. Nachdem im Verlauf der GvHD auch primäre und sekundäre lymphatische Organe geschädigt werden, liegt die Vermutung nahe, dass der adoptive Transfer von Treg-Zellen durch die Protektion dieser Organe die Immunrekonstitution begünstigt. Tatsächlich zeigten Nguyen und Kollegen, dass durch den adoptiven Transfer von Treg-Zellen Organschäden des Thymus, peripherer Lymphknoten und der Milz verhindert werden und das lymphatische Zellkompartiment infolgedessen vollständig rekonstituiert [295]. Des Weiteren erzeugten so geschützte Tiere nach allogener KMT primäre und sekundäre Immunantworten gegen das murine Cytomegalievirus (MCMV).

Somit kann zusammenfassend festgehalten werden, dass die akute GvHD eine Reaktion alloaggressiver T-Zellen gegen das Empfängergewebe ist. Angriffsorte sind dabei Haut, Darm, Leber und das hämatolymphatische System, wobei primär jedoch der Darm das lebensbedrohliche Zielorgan darstellt. Der adoptive Transfer $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen schützt vor letaler GvHD und reduziert die GvHD-assoziierte Morbidität sowie pathologische Veränderungen in Zielorganen. Der protektive Effekt adoptiv transferierter $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen setzt vor allem in der Aktivierungsphase der Spender-T-Zellen an, wodurch die frühe Expansion alloreaktiver T-Zellen unterdrückt wird. Adoptiv transferierte $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen behindern weder das Engraftment der Spenderzellen noch die antitumorale Wirkung von Spender-T-Zellen und ermöglichen eine vollständige Immunrekonstitution nach allogener KMT. Im Hinblick auf die klinische Anwendung natürlicher Treg-Zellen sind diese Befunde vielversprechend, da das Risiko einer GvHD minimiert wird ohne dabei kurative Effekte von Spender-T-Zellen komplett zu lähmen.

5.3 Mausmodell der xenogenen GvHD

Basierend auf der Idee, dass das von van Rijn und Kollegen beschriebene xenogene GvHD-Modell ein geeignetes System darstellt, um die Übertragbarkeit der aus den rein murinen GvHD-Modellen gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu testen, wurde die Funktion humaner Treg-Zellen nach xenogener Transplantation untersucht. In einem ersten Schritt wurden zunächst die humanen Zellpopulationen identifiziert, die an der Induktion der xenogenen Erkrankung beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass im Unterschied zum allogenen KMT-Modell die Transplantation isolierter Spender-T-Zellen nicht ausreicht, um eine letale Erkrankung in $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäusen zu induzieren. Der Transfer der gesamten PBMC-Population hingegen führte zu einer fulminanten Erkrankung mit schwerwiegenden klinischen Symptomen sowie einer hohen Mortalität der Tiere.

Nachdem T-Zellen auf den eigenen MHC restringiert sind und sich HLA- und MHC-Komplex vor über 70 Millionen Jahren auseinander entwickelt haben, ist der zelluläre Mechanismus der direkten xenogenen Erkennung schwierig nachzuvollziehen. Zudem könnte die Spezies-Barriere weitere Einschränkungen der direkten Xenoreaktion mit sich bringen, wie etwa eine unzureichende Kompatibilität von akzessorischen und kostimulatorischen Molekülen oder Zytokinen, die für die Proliferation von T-Zellen essentiell sind. Dennoch wurde in xenogenen *in vitro* und *in vivo* Modellen eine direkte Erkennung von murinen MHC-II-Molekülen durch humane T-Zellen beschrieben [302, 303]. In Übereinstimmung damit entwickelten Tiere, die mit Gesamt-PBMCs transplantiert wurden, nach 2 Wochen einen sehr hohen Spender-Chimärismus, der mit einer rapiden Entwicklung der xenogenen Erkrankung und einer zunehmenden Mortalität der Tiere einherging. Im Gegensatz dazu konnte im PB von Tieren, die mit isolierten Tkonv-Zellen transplantiert wurden, nur ein transienter Anstieg hCD45⁺ Zellen während der ersten Wochen festgestellt werden in dessen Folge diese ein deutlich milderes klinisches Bild entwickelten und mehr als 50 % mit nur leichten klinischen Symptomen überlebten. Demnach scheint die direkte Interaktion von isolierten humanen T-Zellen mit murinen MHC-Molekülen *in vivo* möglich zu sein, jedoch alleine nicht auszureichen, um eine letale xenogene Erkrankung in den Tieren zu induzieren. Daraus ließ sich schließen, dass die xenogene Erkrankung zwar durch T-Zellen ausgelöst wird, „Nicht“-T-Zellen innerhalb der PBMCs das Engraftment humaner T-Zellen aber entscheidend fördern und dadurch die Erkrankung verstärken. Offensichtlich scheint die fehlende Kompatibilität physiologischer Komponenten die Funktion und das Überleben humaner T-Zellen unter xenogenen Bedingungen einzuschränken. In diesem Zusammenhang zeigten *in vitro* Analysen von Alter und Kollegen, dass isolierte T-Zellen nur schwach auf BALB/c-Xenoantigene reagierten, nach Zugabe von bestrahlten PBMCs oder von humanen Zytokinen wie IL-2 oder dem T-Zellwachstumsfaktor (*t cell growth factor*, TCGF) allerdings eine starke proliferative Antwort entwickelten [304]. Infolgedessen könnte das Engraftment, das langfristige Überleben und die Proliferation humaner Tkonv-Zellen unter xenogenen Bedingungen erst nach Produktion der dafür notwendigen Zytokine durch humane „Nicht“-T-Zellen ermöglicht werden.

Weiterhin zeigte die Charakterisierung der humanen hämatopoetischen Zellpopulationen in den Empfängertieren eine ausgeprägte Expansion humaner B-Zellen während der frühen Phase nach Transplantation. Humane B-Zellen könnten die Xenoreaktivität von T-Zellen in diesem Modell über verschiedene Mechanismen verstärken. Zum einen könnten xenoreaktive Antikörper nach ihrer Bindung an Gefäßwände Endothelzellen dazu induzieren, vermehrt Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle zu exprimieren [305], wodurch letztlich die Infiltration der humanen T-Zellen in die Milz und in Zielorgane wie KM, Leber und Lunge begünstigt würde. Zudem könnte dieser Effekt durch NK-Zellen und andere Fc-

Rezeptor-tragende PBMCs potenziert werden, indem diese nach Bindung der adhärennten Immunglobuline durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine verstärkt T-Zellen rekrutieren [306]. Analog dazu konnte 4 Tage nach Transplantation eine ungewöhnlich hohe Frequenz humaner NK-Zellen (30 % im Vergleich zu 5-10 % in PBMCs vor Transplantation) im PB der Empfängertiere detektiert werden. Schlussendlich sind auch B-Zellen effektive APCs, die durch indirekte Präsentation muriner Xenoantigene über HLA-Moleküle, die Aktivierung und Expansion xenoreaktiver T-Zellen vorantreiben könnten. Inwieweit die beschriebenen Mechanismen die Induktion der xenogenen Erkrankung tatsächlich fördern, muss in weiteren Versuchen überprüft werden. Mögliche Ansätze hierfür wären die Analyse der humanen Antikörper-Titer im Serum transplantierte Mäuse bzw. die Transplantation B-Zell-depletierter PBMCs. Die Beobachtung, dass murine APCs nur schwache Stimulatoren humaner T-Zellen darstellen, wurde in einer Vielzahl von Studien beobachtet, weshalb auch in anderen xenogenen Mausmodellen das Vorhandensein humaner APCs als Voraussetzung für eine effektive Xenoreaktivität humaner T-Zellen beschrieben wurde [304, 307-309].

Die Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass der intravenöse Transfer humaner PBMCs zu einer Migration humaner Zellen in Milz, Leber, KM und Lunge führte. Im Einklang mit der Arbeit von van Rijn und Kollegen konnte in der ersten Woche nach Transplantation nur ein Bruchteil der transplantierten humanen Zellen in $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäusen wiedergefunden werden, die höchste Frequenz humaner Zellen fand sich jedoch in der Milz [234]. Diese erwies sich als primäres Organ des Engraftments und der Expansion humaner Zellen nach xenogener Transplantation, wobei vorwiegend humane Lymphozyten (konventionelle $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen sowie B-Zellen) expandierten, allerdings kaum myeloische Zellen. Eine zunehmende Infiltration der Lunge, des KM und der Leber mit Lymphozyten wurde hingegen erst nach 10-14 Tagen nach xenogener Transplantation festgestellt. Analog zum murinen allogenen Transplantationsmodell scheint daher auch im xenogenen Modell das *priming* humaner Zellen in sekundären lymphatischen Organen (hier: Milz) stattzufinden, von wo aus die Ausschwemmung über die Zirkulation in Zielorgane erfolgt. Humanes IFN γ (Th1), IL-5 (Th2) und IL-10 (Th2) waren die prominentesten Zytokine im Serum der Empfängertiere, während weder IL-2 noch IL-4 und kaum TNF produziert wurden. Ein ähnliches Zytokinmuster wurde von Fast und Kollegen beschrieben [310], die das Engraftment von hPBMCs in C57BL/6 $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäusen untersuchten. Für die Effektorphase der akuten GvHD ist jedoch neben IFN γ vor allem TNF von Bedeutung [311]. In der Regel wird TNF von Makrophagen und Monozyten produziert, die nach Translokation von LPS in die systemische Zirkulation in Folge der Konditionierung LPS binden und somit aktiviert werden [312]. Die kaum detektierbaren TNF-Spiegel im Serum xenogen transplantierte $RAG2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäusen könnten daher auf das unzureichende Engraftment humaner Monozyten zurückzuführen sein. Interessanterweise detektierten auch van Rijn und Kollegen kein TNF im Serum

xenotransplantierte Mäuse. IL-5 wird von Th2-Zellen nach Aktivierung durch MHC-II-Peptid-Komplexe auf B-Zellen gebildet und fördert daraufhin deren Proliferation und Antikörperproduktion. Demnach scheint es plausibel, dass gerade in der frühen Phase nach Transplantation, die durch eine ausgeprägte Expansion humaner B-Zellen gekennzeichnet ist, der IL-5-Spiegel im Serum xenogen transplantierte Mäuse am höchsten ist. Die erhöhte IL-5 Produktion könnte auch zur Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen beitragen, da IL-5 für die Generierung von CTLs *in vivo* von Bedeutung zu sein scheint [313]. Daher fügen sich die erhöhten IL-5-Spiegel während der Effektorphase gut in dieses Szenario, da CD8⁺ CTLs die Haupt-Effektoren der xenogenen Erkrankung sind, wie die Untersuchung der Milz ab Tag 10 nach Transplantation zeigte. Ab diesem Zeitpunkt expandierten CD8⁺ T-Zellen zunehmend, während die Zahl der CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen abnahm. Zeitgleich begannen die transplantierten Tiere erste Anzeichen der xenogenen Erkrankung zu entwickeln und kontinuierlich an Gewicht zu verlieren. Darüber hinaus war ein Großteil (> 90 %) der humanen Zellen im KM, Milz und PB von Mäusen, die an der xenogenen Erkrankung verstarben, CD8⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung ist konsistent mit Studien anderer Arbeitsgruppen, die bestätigen, dass CD8⁺ T-Zellen in einer Vielzahl humanisierter Mausmodelle dominieren [314-316].

Die nähere Analyse der Pathologie der xenogenen Erkrankung ließ Zweifel aufkommen bezüglich der Charakterisierung des Krankheitsbildes als GvHD, da sich deutliche Unterschiede zur akuten GvHD im allogenen Mausmodell und zur akuten GvHD des Menschen zeigten. Das klinische Bild der xenogenen Erkrankung war gekennzeichnet durch rapiden Gewichtsverlust, Kyphose, struppiges Fell, verminderte Aktivität, Blässe der Ohren, Mobilitätsstörungen und vor allem eine stark erhöhte Atemfrequenz (Tachypnoe). Die Blässe der Ohren (als klinisches Korrelat einer Anämie) und die Tachypnoe passten nicht zum klinischen Bild der akuten GvHD von allogenen transplantierten BALB/c-Tieren. Andererseits waren klassische Symptome, wie Diarrhö und erythematöse Veränderungen der Haut in RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse nach xenogener Transplantation nicht festzustellen. Im Unterschied zu den publizierten Ergebnissen konnte bei der histopathologischen Beurteilung der Gewebe keine signifikante Zerstörung der klassischen GvHD-Zielorgane Haut und Darm festgestellt werden (**Abb. 4-37**). Ebenso zeigten Leber und Lunge nur diskrete Lymphozyteninfiltrate und kaum echte Gewebeschädigungen. Die Blutanalysen zeigten allerdings, dass das Engraftment humaner Lymphozyten mit einer relativen und absoluten Abnahme muriner hämatopoetischer Zellen einherging und parallel dazu der Schweregrad der xenogenen Erkrankung zunahm. Folgerichtig ließ sich durchflusszytometrisch und histologisch bestätigen, dass es mit voranschreitender Expansion humaner Zellen zum Verlust der murinen Leuko-, Erythro- und Megakaryopoese in KM und Milz kam, so dass im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eine komplette KM-Aplasie sowie eine Fibrosierung der

Milz nachgewiesen wurde. Diese Befunde lieferten die entscheidenden Beweise dafür, dass die xenogene Erkrankung nicht, wie postuliert, die Pathologie der akuten GvHD widerspiegelt, sondern dass diese auf der Abstoßung der murinen Hämatopoese durch humane CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse werden von einer Studie von Hupples und Kollegen, die das Engraftments humaner PBMCs in verschiedenen Xenotransplantationsmodellen untersucht haben und ebenfalls keine pathologisch relevanten Veränderungen des Darms und der Haut nachweisen konnten [317], bestätigt. Bei der akuten GvHD spielen Konditionierungsschäden des Darms und der Haut eine zentrale Rolle für die Induktion der Erkrankung [215, 217] und für die Rekrutierung alloreaktiver T-Zellen zu diesen Zielorganen. Im xenogenen Transplantationsmodell wurden die Tiere lediglich subletal bestrahlt, um das Engraftment der humanen Zellen zu fördern. Die histologische Beurteilung des Darms und der Haut ein Tag nach Bestrahlung zeigte in beiden Organen keine strahlungsinduzierten Veränderungen. Insofern könnte die fehlende Pathologie in Darm und Haut der xenogen erkrankten Tiere durch das geringere inflammatorische Milieu in diesen Geweben nach subletaler Konditionierung erklärt werden. Entscheidender scheint jedoch ein insuffizientes *homing* xenoreaktiver T-Zellen zu sein. In allogenen GvHD-Modellen ist die Migration alloreaktiver T-Zellen in das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) eine zentrale Voraussetzung für die Induktion der Darm-GvHD [318, 319]. RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse haben aufgrund ihrer Gendefekte unterentwickelte sekundäre Lymphorgane und besitzen keine mesenterialen Lymphknoten ([320] und eigene Beobachtung). So könnte durch ineffizientes *homing* xenoreaktiver T-Zellen in das GALT von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen der Darm vor Organschäden geschützt sein. Der rapide Gewichtsverlust der Tiere im Krankheitsverlauf wurde in den durchgeführten Experimenten nicht durch eine xenogene Kolitis verursacht, sondern war die Folge der KM-Aplasie und der dadurch hervorgerufenen Kachexie [321]. Dazu passend weist die erhöhte Atemfrequenz der kranken Tiere auf den Anämie-bedingten Sauerstoffmangel hin.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass xenoreaktive humane T-Zellen zwar diskrete Zeichen einer GvHD in Lunge und Leber hervorrufen, jedoch in den primären und entscheidenden GvHD-Zielorganen Darm und Haut keine Pathologie verursachen. Die Letalität der xenogenen Erkrankung wird vielmehr durch die Abstoßung der murinen Hämatopoese ausgelöst. Somit entspricht die xenogene Erkrankung in wesentlichen Punkten nicht, wie bisher beschrieben, dem Krankheitsbild der akuten GvHD und ist aus diesem Grund für die Untersuchung GvHD-relevanter Fragestellungen nur bedingt geeignet.

Aufbauend auf den bis dahin gewonnenen Erkenntnissen zur Pathologie der xenogenen Erkrankung wurde die Hypothese formuliert, dass die suppressive Aktivität humaner Treg-

Zellen nach adoptivem Transfer zu einer verminderten Expansion humaner Tkonv-Zellen führen könnte und dadurch Empfängertiere vor der Abstoßung der murinen Hämatopoese geschützt würden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden adoptive Transferexperimente durchgeführt, in denen – analog zum rein murinen GvHD-Modell – Treg-Subpopulationen und Tkonv-Zellen im Verhältnis 1:1 transplantiert wurden. Zunächst wurde ihr Einfluss auf das Überleben der Tiere untersucht. Der adoptive Transfer von RA⁺ Treg-Zellen zeigte in der frühen Phase der xenogenen Erkrankung zunächst deutliche protektive Effekte. Im Vergleich zu Kontrolltieren war der Spender-Chimärismus 2 Wochen nach Transplantation um 70 % reduziert, die Spiegel humaner Zytokine im Serum waren initial reduziert, die Tiere entwickelten klinische Symptome erst zeitverzögert und waren bis Tag 28 vor dem letalen Verlauf der Erkrankung geschützt. Im Gegensatz dazu hatte der adoptive Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen keine immunmodulierende Wirkung und die Tiere zeigten den selben Krankheitsverlauf wie xenogen transplantierte Kontrolltiere. Diese Befunde bestätigten *in vitro* Analysen, die auf eine bessere suppressive Aktivität expandierter RA⁺ Treg Zellen hinwiesen. Mutis und Kollegen beschrieben allerdings, dass der adoptive Transfer von humanen CD4⁺CD25⁺ Zellen im xenogenen Transplantationsmodell das Überleben der Tiere verbessert [322]. In ihren Untersuchungen überlebten bis Tag 60 28-60 % der Tiere nach adoptivem Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen, während dies nur bei 15 % der Kontrolltiere der Fall war. Im Unterschied hierzu zeigte sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nur eine Verzögerung des Sterbezeitpunkts nach Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen, ein Auftreten und Voranschreiten der Erkrankung konnte dagegen nicht verhindert werden. So war an Tag 60 mit je 20 % Überleben von Kontrolltieren und Tieren, die mit RA⁺ Treg-Zellen kotransplantiert wurden, im Vergleich zu 26,7 % nach adoptivem Transfer RA⁺ Treg-Zellen kein relevanter Unterschied mehr feststellbar. Zu den von Mutis und Kollegen beschriebenen Resultaten ist kritisch anzumerken, dass die Ergebnisse von Experiment zu Experiment sehr variabel waren (zwischen 28-60 % Überleben in den Behandlungsgruppen) und die geringe Zahl an Versuchstieren pro Experiment das Risiko erhöht, zufällige statt statistisch signifikante Ergebnisse zu produzieren. Unterschiede im experimentellen Design könnten ebenfalls zu den divergenten Ergebnissen beigetragen haben. So wurden in den von Mutis und Kollegen beschriebenen Experimenten z.B. unterschiedliche Mengen an PBMCs transplantiert, so dass es bei intermediären und niedrigen Zellzahlen zu einem verzögerten oder vergleichsweise geringen Engraftment humaner Zellen kam und die Abstoßung der murinen Hämatopoese in diesen Tieren wahrscheinlich nicht vollständig war. Unter diesen Bedingungen könnten bereits geringgradige Treg-vermittelte Suppressionvorgänge in der Induktionsphase zur Verbesserung der Überlebenskurven führen. Darüber hinaus wurde die von den Autoren eingesetzte Treg-Fraktion mittels MACS-Technik isoliert und enthielt aufgrund der geringeren

Reinheit auch andere humane Zellen, die die Funktion von Treg-Zellen *in vivo* gefördert haben könnten. Außerdem wurde die Treg-Zell-Population nicht *in vitro* expandiert, so dass eine bessere Überlebensfähigkeit frisch isolierter im Vergleich zu expandierten Treg-Zellen für das bessere Überleben der Tiere verantwortlich sein könnte. Die Migrations- und Überlebensfähigkeit expandierter Treg-Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausführlich untersucht. Durch Verabreichung CFSE-markierter Treg-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Treg-Zellen prinzipiell sowohl in die Milz als auch das KM der Empfängertiere migrieren können. Jedoch war auffällig, dass der Anteil CFSE⁺ Treg-Zellen im Vergleich zu Tkonv-Zellen bereits nach 4 Tagen nur noch sehr gering war, so dass durch Vergleich der Absolutzellzahlen aus der Milz nachgewiesen wurde, dass Tkonv-Zellen expandieren, während Treg-Zellen absterben. Analysen der FOXP3-Expression in Folgeexperimenten schlossen jedoch einen Verlust der CFSE⁺ Zellen durch Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes nach Proliferation aus. Daraus konnte gefolgert werden, dass die eingeschränkte Überlebensfähigkeit *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen für die transiente Wirkung der Zellen hauptsächlich verantwortlich ist. Da IL-2 für das Überleben und die Funktion natürlicher Treg-Zellen *in vivo* und *in vitro* benötigt wird [169, 262-266], wurde in Nachfolgeexperimenten IL-2 substituiert. Doch weder die exogene Zufuhr von humanem IL-2 noch der verzögerte Transfer natürlicher Treg-Zellen (Tag 4 nach PBMC-Transplantation) führten zu einer Steigerung der suppressiven Wirkung, so dass bewiesen wurde, dass weder IL-2 alleine noch die von PBMCs sezernierten Zytokine ausreichen, das Überleben der Treg-Zellen signifikant zu fördern. Der verzögerte Transfer RA⁻ Treg-Zellen führte sogar zu einer Beschleunigung der xenogenen Erkrankung. Die RA⁻ Treg-Subpopulation enthält nach Expansion (im Gegensatz zur RA⁺ Treg-Population) IL-2- und IFN γ -produzierende Zellen, die aus der Konversion antigenerfahrener Treg-Zellen nach repetitiver Stimulation entstehen [267]. Die Aktivierung RA⁻ Treg-Zellen durch das an Tag 4 vorherrschende Zytokinmilieu könnte daher zu einer verstärkten Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN γ führen, was wiederum die Xenoreaktivität der Tkonv-Zellen gegebenenfalls sogar begünstigt.

Eine erst kürzlich erschienene Studie beschreibt, dass der adoptive Transfer *in vitro* expandierter Treg-Zellen aus Nabelschnurblut die Tiere vor einer xenogenen Erkrankung schützen kann [323], jedoch unterschied sich das Versuchsmodell von dem der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Punkten. So verwendeten die Autoren RAG2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäuse auf einem C57BL/6-Hintergrund im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten BALB/c RAG2^{-/-} γ c^{-/-} Mäusen. Damit dienten in beiden Systemen verschiedene Xenoantigene als Stimulus, was möglicherweise mit einer unterschiedlichen Frequenz aktivierter Tkonv-Zellen und Treg-Zellen einhergehen könnte. Des Weiteren enthielt die expandierte Treg-Population einen nicht unerheblichen Anteil nicht genauer definierter humaner Zellen, welche die Funktion der

Treg-Zellen *in vivo* begünstigen könnten. Schlussendlich – und vermutlich für das abweichende Resultat hauptsächlich verantwortlich – wurden PBMCs und Treg-Zellen aus unterschiedlichen, HLA-differenten Spendern verwendet. Da natürliche Treg-Zellen *per se* nicht suppressiv sind, sondern zur Erlangung ihrer suppressiven Eigenschaften über ihren TCR aktiviert werden müssen [144], könnte eine Stimulation von Treg-Zellen über HLA-differente humane DCs erfolgt sein und dadurch – unabhängig von xenogener Stimulation – deren suppressive Funktion gefördert haben. Da eine suffiziente Stimulation der Treg-Zellen alleine durch murine APCs *in vivo* nicht ausreichend zu sein scheint, erscheinen die Überlebensbedingungen der Treg-Zellen in dem gewählten xenogenen Transplantationsmodell limitierend. Offensichtlich sind *in vitro* expandierte RA⁺ Treg-Zellen unter xenogenen Bedingungen in Bezug auf Aktivierung, Proliferation und Überleben gegenüber humanen Tkonv-Zellen benachteiligt. Speziesbarrieren bezüglich kostimulatorischer Moleküle, Adhäsions- und Migrationsfaktoren sowie relevanter Zytokine scheinen deshalb insbesondere für Treg-Zellen von Bedeutung zu sein. Die genaue Charakterisierung dieser differenziellen Empfindlichkeit von Tkonv- und Treg-Zellen im xenogenen Modell ist aus biologischer Sicht zwar interessant, wurde im Hinblick auf die ursprüngliche Arbeitshypothese im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter verfolgt.

In Übereinstimmung mit dem rein murinen GvHD-Modell ist für die Abstoßung der murinen Hämatopoese ebenfalls eine starke Aktivierung und Expansion von Tkonv-Zellen erforderlich. Analog zum Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen die frühe Expansion humaner CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hemmt, damit einhergehend deren Effektorfunktionen (Produktion proinflammatorischer Zytokine) reduziert und daraus resultierend pathologische Veränderungen in Zielorganen sowie die Morbidität der Empfängertiere in der frühen Phase nach Transplantation minimiert. Wie anfangs bereits beschrieben, scheinen natürliche Treg-Zellen über ein Arsenal verschiedenster Suppressionsmechanismen zu verfügen, die die Proliferation und Funktion der Tkonv-Zellen sowohl direkt als auch indirekt beeinträchtigen können (vgl. 1.3.2.3). Bemerkenswerterweise verhinderte der Transfer RA⁺ Treg-Zellen in besonderem Maße die Expansion humaner B-Zellen. Die direkte Suppression von B-Zellen durch natürliche Treg-Zellen wurde ebenfalls im Mausmodell beobachtet [146, 165, 324]. Als Mechanismus wurde von den Autoren dabei eine durch Granzym B-vermittelte Lyse der Zielzellen postuliert, wobei interessanterweise präferentiell antigenpräsentierende B-Zellen zerstört wurden. Eine erst kürzlich erschienene Studie konnte zudem zeigen, dass humane natürliche Treg-Zellen nach Interaktion mit humanen B-Zellen die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 hemmen und somit deren immunstimulatorische Aktivität herabsetzen [325]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, scheinen insbesondere B-Zellen die Xenoreaktivität humaner T-Zellen zu fördern und dadurch die xenogene Erkrankung zu

verstärken. Eine präferentielle Lyse bzw. die Suppression immunstimulatorischer Eigenschaften antigenpräsentierender humaner B-Zellen in der frühen Phase nach Transplantation könnte somit die Reduktion xenoaggressiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie den protektiven Effekt nach adoptivem Transfer RA⁺ Treg-Zellen erklären. Inwieweit die reduzierte Expansion xenoreaktiver T-Zellen in der frühen Phase nach adoptivem Transfer RA⁺ Treg-Zellen durch die Reduktion antigenpräsentierender B-Zellen vermittelt wird oder ob andere Mechanismen dafür verantwortlich sind, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Von entscheidender Bedeutung in Hinblick auf die ursprüngliche Hypothese war jedoch, dass der adoptive Transfer RA⁺ Treg-Zellen auch in der frühen Phase nach xenogener Transplantation die Expansion und Zytokinproduktion xenoreaktiver T-Zellen nicht beeinflussen konnte. Damit zeigte sich auch *in vivo*, dass RA⁺ Treg-Zellen keine proinflammatorischen Eigenschaften besitzen und stärkere suppressive Eigenschaften aufweisen als *in vitro* expandierte RA⁺ Treg-Zellen.

So kann zusammenfassend festgehalten werden, dass der adoptive Transfer *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen in der frühen Phase eine Suppression humaner xenoreaktiver T-Zellen bewirkt und dadurch die Induktion und die Mortalität der xenogenen Erkrankung verzögert. Die Ursache der nur transienten Suppression scheint auf die unter xenogenen Bedingungen eingeschränkte Überlebensfähigkeit der expandierten Treg-Zellen zurückzuführen zu sein. Die dafür verantwortlichen Faktoren konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch spielen diese Faktoren bei der klinischen Anwendung eine untergeordnete Rolle, da unsere Arbeitsgruppe im Rahmen eines Heilversuches kürzlich nachweisen konnte, dass adoptiv transferierte RA⁺ Treg-Zellen nach *in vitro* Expansion über Monate im PB nachweisbar bleiben (Prof. Dr. Edinger, unpublizierte Daten). Die prophylaktische oder therapeutische Anwendung *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen des Stammzellspenders ist deshalb nach wie vor eine vielversprechende Strategie in der Transplantationsmedizin.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Für den therapeutischen Erfolg der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) bei hämatologischen Neoplasien sind neben der Konditionierung vor allem reife Spender-T-Zellen des Transplantats verantwortlich. Abgesehen von den gewünschten kurativen Effekten induzieren Spender-T-Zellen jedoch auch die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft-versus-host disease*, GvHD) – eine der Hauptursachen für die Morbidität und Mortalität nach allogener HSCT. Zur Prophylaxe und Therapie der GvHD werden derzeit unspezifisch wirkende Immunsuppressiva eingesetzt, die zu schweren Nebenwirkungen führen und die vorteilhaften Effekte der Spender-T-Zellen blockieren. Daher ist es Ziel zahlreicher Studien, neue Therapieansätze zu entwickeln, die das Risiko einer GvHD minimieren, ohne dabei die heilsamen Effekte der Spender-T-Zellen abzuschwächen. In Mausmodellen der allogenen Knochenmarktransplantation (KMT) konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer $CD4^+CD25^+$ natürlicher regulatorischer T-Zellen (Treg) effektiv vor letaler GvHD schützt und gleichzeitig die heilsame Wirkung der Spender-T-Zellen aufrechterhält. Da humane natürliche Treg-Zellen murinen $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen in ihren immunregulierenden Fähigkeiten entsprechen, ist eine Wirkung adoptiv transferierter humaner natürlicher Treg-Zellen bei der Therapie der GvHD des Menschen durchaus vorstellbar. Aufgrund der geringen Frequenz humaner natürlicher Treg-Zellen im peripheren Blut (PB) ist die *in vitro* Expansion dieser Zellen notwendig, um ausreichende Zellzahlen für therapeutische Strategien zu generieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden humane natürliche Treg-Zellen vor und nach Expansion funktionell und phänotypisch charakterisiert sowie die suppressive Wirkung *in vitro* expandierter Treg-Zellen in einem xenogenen Transplantationsmodells untersucht.

Im Gegensatz zu murinen $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen enthält die $CD25^+$ Zellpopulation humaner $CD4^+$ Zellen auch kürzlich aktivierte T-Zellen mit intermediärer $CD25$ -Expression, während sich natürliche Treg-Zellen durch eine sehr hohe $CD25$ -Expression auszeichnen ($CD25^{\text{high}}$). Für die Charakterisierung humaner Treg-Zellen aus dem PB adulter Spender sind hochreine Zellpräparate erforderlich, weshalb in unserer Arbeitsgruppe entsprechende Isolierungs- und Expansionsprotokolle etabliert wurden. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 ist sowohl für die Entwicklung als auch für die Aufrechterhaltung der suppressiven Eigenschaften natürlicher Treg-Zellen verantwortlich. Die Analyse der FOXP3-Expression zeigte eine präferentielle Expression in $CD4^+CD25^{\text{high}}$ T-Zellen, die auch nach Expansion erhalten blieb. Bestätigt durch funktionelle *in vitro*-Analysen konnte so nachgewiesen werden, dass durch dieses Protokoll humane $CD4^+CD25^{\text{high}}$ Treg-Zellen effizient isoliert und expandiert werden können. Die weiterführende Charakterisierung ergab, dass vor allem naive $CD45RA^+CD4^+CD25^{\text{high}}$ Treg-Zellen (RA^+) einen stabilen Treg-Phänotyp beibehalten,

während antigenerfahrene CD45RA⁻CD4⁺CD25^{high} Treg-Zellen (RA⁻) nach repetitiver Stimulation ihre phänotypischen, molekularen und funktionellen Treg-charakteristischen Eigenschaften zunehmend verlieren. Die Validierung der expandierten naiven und antigen-erfahrenen Treg-Zellen im xenogenen Transplantationsmodell bestätigte die *in vitro*-Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Transfer RA⁺ Treg-Zellen zu einer wirkungsvollen Suppression der Expansion und Effektorfunktionen xenoreaktiver T-Zellen früh nach Transplantation führt. Der adoptive Transfer expandierter RA⁻ Treg-Zellen hingegen hatte keine immunregulatorische Wirkung, sondern führte nach zeitlich verzögerter Transplantation vielmehr zu einer Verstärkung der xenogenen Erkrankung und zu einer erhöhten Mortalität. Damit zeigte sich auch *in vivo*, dass expandierte RA⁺ Treg-Zellen keine inflammatorischen Eigenschaften besitzen und über eine stärkere suppressive Kapazität als *in vitro* expandierte RA⁻ Treg-Zellen verfügen. Die Suppression durch expandierte RA⁺ Treg-Zellen konnte allerdings nur in der frühen Phase nach xenogener Transplantation nachgewiesen werden und war durch die eingeschränkte Überlebensfähigkeit *in vitro* expandierter Treg-Zellen unter xenogenen Bedingungen beeinträchtigt. Nachdem unsere Arbeitsgruppe im Rahmen eines Heilversuches zeigen konnte, dass adoptiv transferierte RA⁺ Treg-Zellen über Monate im PB von GvHD Patienten nachweisbar bleiben, scheint die eingeschränkte Überlebensfähigkeit *in vitro* expandierter RA⁺ Treg-Zellen auf die Speziesbarriere zurückzuführen zu sein.

Durch präzise Charakterisierung des xenogenen Transplantationsmodells konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Verlauf der xenogenen Erkrankung zwar eine Infiltration von Lunge und Leber durch humane Lymphozyten beobachtet werden kann, entscheidende GvHD-Zielorgane wie Darm und Haut von der Erkrankung aber verschont bleiben. Die Letalität der xenogenen Erkrankung wird statt durch GvHD-typische Organzerstörungen durch die Abstoßung der murinen Hämatopoese verursacht, so dass dieses Modell für GvHD-relevante Fragestellungen nicht geeignet erscheint.

In zukünftigen Experimenten sollte untersucht werden, ob eine „Humanisierung“ von RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen die Untersuchung alloreaktiver T-Zellen *in vivo* ermöglicht. Arbeiten anderer Gruppen zeigten, dass die Transplantation von humanen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen in neugeborene RAG2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse zur Entwicklung eines funktionellen humanen adaptiven Immunsystems führt. Dabei kommt es zur Ausbildung immunkompetenter B- und T-Zellen, NK-Zellen und dendritischer Zellen (DC) sowie zur Repopulation der Lymphorgane ohne Zeichen einer Xenoreaktivität. Durch Verwendung solcher Tiere könnte untersucht werden, ob sich in diesen nach Transfer HLA-differenter humaner T-Zellen eine GvHD induzieren lässt und ob diese durch adoptiv transferierte humane natürliche Treg-Zellen inhibiert werden kann. Hierdurch könnten humane Treg-Zell-Populationen *in vivo* getestet

und ideale Subpopulationen für die künftige klinische Anwendung in der Transplantationsmedizin identifiziert werden.

7 Literatur

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth Edition ed. 2003, Philadelphia: Saunders.
2. Passegue, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
3. Lehrer, R.I., *Primate defensins*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(9): p. 727-38.
4. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
5. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
6. Abbas, A.K. and C.A. Janeway, Jr., *Immunology: improving on nature in the twenty-first century*. Cell, 2000. **100**(1): p. 129-38.
7. Burnet, F.M., *The Clonal Selection Theory*. London: Cambridge University Press, 1959.
8. Matsuuchi, L. and M.R. Gold, *New views of BCR structure and organization*. Current Opinion in Immunology, 2001. **13**(3): p. 270-277.
9. Schwarz, B.A. and A. Bhandoola, *Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 47-57.
10. Call, M.E. and K.W. Wucherpfennig, *THE T CELL RECEPTOR: Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**(1): p. 101-125.
11. Benacerraf, B. and H.O. McDevitt, *Histocompatibility-linked immune response genes*. Science, 1972. **175**(19): p. 273-9.
12. Bjorkman, P.J., *MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions*. Cell, 1997. **89**(2): p. 167-70.
13. The, M.H.C.s.c., *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex*. Nature, 1999. **401**(6756): p. 921-923.
14. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**(1): p. 975-1028.
15. Gao, G.F., Z. Rao, and J.I. Bell, *Molecular coordination of [alpha][beta] T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands*. Trends in Immunology, 2002. **23**(8): p. 408-413.
16. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties*. Annual Review of Immunology, 1989. **7**(1): p. 145-173.
17. Bottomly, K., *A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes*. Immunol Today, 1988. **9**(9): p. 268-74.
18. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
19. Stockinger, B. and M. Veldhoen, *Differentiation and function of Th17 T cells*. Current Opinion in Immunology, 2007. **19**(3): p. 281-286.
20. Kagi, D., et al., *Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo*. Annual Review of Immunology, 1996. **14**(1): p. 207-232.
21. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 1996. **272**(5258): p. 50-3.
22. Parijs, L.V. and A.K. Abbas, *Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes off*. Science, 1998. **280**(5361): p. 243-248.
23. Schwartz, R.H., *Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1065-8.

24. Malek, T.R., *The Biology of Interleukin-2*. Annual Review of Immunology, 2008. **26**(1): p. 453-479.
25. Hildeman, D., et al., *Apoptosis and the homeostatic control of immune responses*. Current Opinion in Immunology, 2007. **19**(5): p. 516-521.
26. Becker, T.C., et al., *Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-specific Memory CD8 T Cells*. J. Exp. Med., 2002. **195**(12): p. 1541-1548.
27. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-432.
28. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett, *Diverse function of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis*. Annual Review of Immunology, 2006. **24**(1): p. 657-679.
29. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annual Review of Immunology, 2003. **21**(1): p. 139-176.
30. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1032-9.
31. Kyewski, B. and L. Klein, *A central role for central tolerance* Annual Review of Immunology, 2006. **24**(1): p. 571-606.
32. Anderson, M.S., et al., *Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-1401.
33. van Noort, J.M., et al., *Minor myelin proteins can be major targets for peripheral blood T cells from both multiple sclerosis patients and healthy subjects*. J Neuroimmunol, 1993. **46**(1-2): p. 67-72.
34. Lohmann, T., R.D. Leslie, and M. Londei, *T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes*. J Autoimmun, 1996. **9**(3): p. 385-9.
35. Page, D.M., *Cutting edge: thymic selection and autoreactivity are regulated by multiple coreceptors involved in T cell activation*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3577-81.
36. Li, L. and V.A. Boussiotis, *Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications*. J Mol Med, 2006. **84**(11): p. 887-99.
37. Walker, L.S. and A.K. Abbas, *The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 11-9.
38. Alferink, J., et al., *Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1338-41.
39. Zinkernagel, R.M., *Immunology Taught by Viruses*. Science, 1996. **271**(5246): p. 173-178.
40. Streilein, J.W., *Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues*. Transplant Proc, 1996. **28**(4): p. 2066-70.
41. Kurts, C., et al., *Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Cross-presentation Is Biased towards High Dose Antigens and Those Released during Cellular Destruction*. J. Exp. Med., 1998. **188**(2): p. 409-414.
42. Jenkins, M.K. and R.H. Schwartz, *Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1987. **165**(2): p. 302-19.
43. Krummel, M.F., T.J. Sullivan, and J.P. Allison, *Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo*. Int Immunol, 1996. **8**(4): p. 519-23.
44. Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone, *CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2541-50.
45. Perez, V.L., et al., *Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 411-7.
46. Walunas, T.L. and J.A. Bluestone, *CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3855-60.
47. Tivol, E.A., et al., *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 541-7.

48. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4*. Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
49. Lechner, O., et al., *Fingerprints of anergic T cells*. Curr Biol, 2001. **11**(8): p. 587-95.
50. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
51. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
52. Nishimura, H., et al., *Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5502): p. 319-22.
53. Nielsen, C., et al., *Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes*. Tissue Antigens, 2003. **62**(6): p. 492-7.
54. Prokunina, L., et al., *A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans*. Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 666-9.
55. Sharma, K., et al., *Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand*. Pharmacol Ther, 2000. **88**(3): p. 333-47.
56. Pawelec, G., et al., *Decreased proliferative capacity and increased susceptibility to activation-induced cell death in late-passage human CD4⁺ TCR2⁺ cultured T cell clones*. Exp Gerontol, 1996. **31**(6): p. 655-68.
57. Fisher, G.H., et al., *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Cell, 1995. **81**(6): p. 935-46.
58. Mauri, C. and M.R. Ehrenstein, *The '[]short' history of regulatory B cells*. Trends in Immunology, 2008. **29**(1): p. 34-40.
59. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annual Review of Immunology, 2003. **21**(1): p. 685-711.
60. Battaglia, M., et al., *Tr1 cells: From discovery to their clinical application*. Seminars in Immunology, 2006. **18**(2): p. 120-127.
61. Weiner, H.L., *Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells*. Microbes and Infection, 2001. **3**(11): p. 947-954.
62. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
63. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
64. Mauri, C., et al., *Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 489-501.
65. Adler, H.S. and K. Steinbrink, *Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe!* Eur J Dermatol, 2007. **17**(6): p. 476-91.
66. Munn, D.H., et al., *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1867-70.
67. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
68. Chatenoud, L., B. Salomon, and J.A. Bluestone, *Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity!* Immunol Rev, 2001. **182**: p. 149-63.
69. Nishizuka, Y. and T. Sakakura, *Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice*. Science, 1969. **166**(906): p. 753-5.
70. Penhale, W.J., et al., *Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats*. Clin Exp Immunol, 1973. **15**(2): p. 225-36.
71. Penhale, W.J., et al., *Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells*. Clin Exp Immunol, 1976. **25**(1): p. 6-16.
72. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka, *Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis*. J Exp Med, 1982. **156**(6): p. 1577-86.
73. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of*

- self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
74. Jiang, H., S.I. Zhang, and B. Pernis, *Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis*. Science, 1992. **256**(5060): p. 1213-5.
 75. Jiang, H., et al., *Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule*. Immunity, 1995. **2**(2): p. 185-94.
 76. Sonoda, K.H., et al., *NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 42-50.
 77. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 782-9.
 78. Chen, W., et al., *Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1846-53.
 79. Young, K.J., et al., *Antitumor activity mediated by double-negative T cells*. Cancer Res, 2003. **63**(22): p. 8014-21.
 80. Mills, K.H., *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 841-55.
 81. Miller, A., et al., *Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 421-5.
 82. Seder, R.A., et al., *Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production*. J Immunol, 1998. **160**(12): p. 5719-28.
 83. Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell, *Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 455-71.
 84. Horwitz, D.A., *Transforming growth factor-beta: taking control of T cells' life and death*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 399-401.
 85. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
 86. Steinbrink, K., et al., *CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2468-76.
 87. Koppelman, B., et al., *Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 861-71.
 88. Willems, F., et al., *Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 1007-9.
 89. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4772-80.
 90. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
 91. Groux, H., et al., *Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 19-29.
 92. Barrat, F.J., et al., *In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 603-16.
 93. Cottrez, F. and H. Groux, *Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells*. Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S12-5.
 94. Wildbaum, G., N. Netzer, and N. Karin, *Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 701-10.
 95. Chen, C., et al., *Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 733-44.

96. Holler, E., et al., *Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(3): p. 237-41.
97. Baker, K.S., et al., *High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplant recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(11): p. 1123-9.
98. VanBuskirk, A.M., et al., *Human allograft acceptance is associated with immune regulation*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 145-55.
99. Bacchetta, R., et al., *High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 493-502.
100. Weston, L.E., A.F. Geczy, and H. Briscoe, *Production of IL-10 by alloreactive sibling donor cells and its influence on the development of acute GVHD*. Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(2): p. 207-12.
101. Battaglia, M., et al., *Tr1 cells: from discovery to their clinical application*. Semin Immunol, 2006. **18**(2): p. 120-7.
102. Seddon, B. and D. Mason, *The third function of the thymus*. Immunol Today, 2000. **21**(2): p. 95-9.
103. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 387-96.
104. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
105. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
106. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 135-42.
107. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
108. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
109. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-1061.
110. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
111. Godfrey, V.L., J.E. Wilkinson, and L.B. Russell, *X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse*. Am J Pathol, 1991. **138**(6): p. 1379-87.
112. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
113. Chatila, T.A., et al., *JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. R75-81.
114. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
115. van der Vliet, H.J. and E.E. Nieuwenhuis, *IPEX as a result of mutations in FOXP3*. Clin Dev Immunol, 2007. **2007**: p. 89017.
116. Itoh, M., et al., *Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
117. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 301-6.
118. Kawahata, K., et al., *Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and*

- from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol*, 2002. **168**(9): p. 4399-405.
119. Hsieh, C.S., et al., *Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 267-77.
 120. Bensinger, S.J., et al., *Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells*. *J Exp Med*, 2001. **194**(4): p. 427-38.
 121. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. *Immunity*, 2000. **12**(4): p. 431-40.
 122. Kumanogoh, A., et al., *Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 353-60.
 123. Apostolou, I. and H. von Boehmer, *In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells*. *J Exp Med*, 2004. **199**(10): p. 1401-8.
 124. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
 125. Yamagiwa, S., et al., *A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood*. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7282-9.
 126. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. *J Immunol*, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
 127. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. *J Exp Med*, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
 128. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
 129. Horwitz, D.A., et al., *Regulatory T cells generated ex vivo as an approach for the therapy of autoimmune disease*. *Semin Immunol*, 2004. **16**(2): p. 135-43.
 130. DiPaolo, R.J., et al., *Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(7): p. 4685-93.
 131. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
 132. Huter, E.N., et al., *TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(7): p. 1814-21.
 133. Horwitz, D.A., et al., *Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(4): p. 912-5.
 134. Shevach, E.M., et al., *The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(4): p. 915-7.
 135. Sugamura, K., N. Ishii, and A.D. Weinberg, *Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(6): p. 420-31.
 136. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 503-13.
 137. McHugh, R.S., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. *Immunity*, 2002. **16**(2): p. 311-23.
 138. Bruder, D., et al., *Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(3): p. 623-30.
 139. Hansen, W., et al., *G protein-coupled receptor 83 overexpression in naive CD4+CD25- T cells leads to the induction of Foxp3+ regulatory T cells in vivo*. *J Immunol*, 2006. **177**(1): p. 209-15.
 140. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(6): p. 389-400.

141. Su, L., et al., *Murine CD4+CD25+ regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 4994-5001.
142. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production*. J. Exp. Med., 1998. **188**(2): p. 287-296.
143. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int. Immunol., 1998. **10**(12): p. 1969-1980.
144. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 183-90.
145. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1137-40.
146. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4180-3.
147. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 834-42.
148. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
149. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4516-20.
150. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4676-80.
151. Gri, G., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction*. Immunity, 2008. **29**(5): p. 771-81.
152. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
153. Vignali, D., *How many mechanisms do regulatory T cells need?* Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 908-11.
154. Kearley, J., et al., *Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1539-47.
155. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
156. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 137-61.
157. Piccirillo, C.A., et al., *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 237-46.
158. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
159. Green, E.A., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10878-83.
160. Fahlen, L., et al., *T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 737-46.
161. Li, M.O., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell, *T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 579-91.

162. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
163. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
164. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
165. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
166. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
167. Ren, X., et al., *Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(12): p. 2076-84.
168. Garin, M.I., et al., *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2058-65.
169. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
170. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
171. D'Cruz, L.M. and L. Klein, *Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1152-9.
172. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
173. Thornton, A.M., et al., *Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6519-23.
174. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
175. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
176. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
177. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
178. Tang, Q., et al., *Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 83-92.
179. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 505-11.
180. Oderup, C., et al., *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression*. Immunology, 2006. **118**(2): p. 240-9.
181. Serra, P., et al., *CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells*. Immunity, 2003. **19**(6): p. 877-89.
182. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
183. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
184. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars, *CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1538-43.

185. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
186. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
187. Jonuleit, H., et al., *Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 255-60.
188. Jacobson, D.L., et al., *Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **84**(3): p. 223-43.
189. Ermann, J. and C.G. Fathman, *Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 759-61.
190. Longhi, M.S., et al., *Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease*. J Hepatol, 2004. **41**(1): p. 31-7.
191. Liu, M.F., et al., *Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus*. Scand J Immunol, 2004. **59**(2): p. 198-202.
192. Sugiyama, H., et al., *Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 164-73.
193. Cao, D., et al., *Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol, 2003. **33**(1): p. 215-23.
194. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
195. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
196. Balandina, A., et al., *Analysis of CD4+CD25+ cell population in the thymus from myasthenia gravis patients*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **998**: p. 275-7.
197. Hafler, D.A., et al., *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study*. N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 851-62.
198. Nejentsev, S., et al., *Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 887-892.
199. Suttmoller, R.P., et al., *Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 823-32.
200. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
201. Onizuka, S., et al., *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody*. Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3128-33.
202. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 295-307.
203. Suvas, S., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4123-32.
204. Hesse, M., et al., *The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3157-66.
205. Belkaid, Y., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 502-7.
206. Kinter, A.L., et al., *CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 331-43.

207. Pereira, L.E., et al., *Simian immunodeficiency virus (SIV) infection influences the level and function of regulatory T cells in SIV-infected rhesus macaques but not SIV-infected sooty mangabeys*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4445-56.
208. Xu, D., et al., *Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 739-47.
209. Martin, P., and Kernan, N., *T-cell depletion for GVHD prevention in humans*. Marcel Dekker Inc., New York, 1997: p. pp. 618-637.
210. Hoffmann, P., et al., *Immunomodulation after allogeneic bone marrow transplantation by CD4+CD25+ regulatory T cells*. Microbes Infect, 2005. **7**(7-8): p. 1066-72.
211. Appelbaum, F.R., *The current status of hematopoietic cell transplantation*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 491-512.
212. Suchin, E.J., et al., *Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 973-81.
213. Gould, D.S. and H. Auchincloss, Jr., *Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection*. Immunol Today, 1999. **20**(2): p. 77-82.
214. Jacobsohn, D.A. and G.B. Vogelsang, *Acute graft versus host disease*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 35.
215. Reddy, P. and J.L. Ferrara, *Immunobiology of acute graft-versus-host disease*. Blood Rev, 2003. **17**(4): p. 187-94.
216. Sun, Y., et al., *Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances*. Transl Res, 2007. **150**(4): p. 197-214.
217. Hill, G.R. and J.L. Ferrara, *The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2754-9.
218. Xun, C.Q., et al., *Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2360-7.
219. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
220. Wysocki, C.A., et al., *Leukocyte migration and graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4191-9.
221. Hoffmann, P., et al., *Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 389-99.
222. Edinger, M., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1144-50.
223. Ermann, J., et al., *Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2220-6.
224. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar, *The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3493-9.
225. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 401-6.
226. Trenado, A., et al., *Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1688-96.
227. Joffre, O., et al., *Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4216-21.
228. Hanash, A.M. and R.B. Levy, *Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1828-36.
229. Dieckmann, D., et al., *Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1303-10.

230. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
231. Zhai, Z., et al., *Correlation of the CD4+CD25high T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD*. Transpl Int, 2007. **20**(5): p. 440-6.
232. Rezvani, K., et al., *High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1291-1297.
233. Shultz, L.D., F. Ishikawa, and D.L. Greiner, *Humanized mice in translational biomedical research*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 118-30.
234. van Rijn, R.S., et al., *A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2-/-gammac-/- double-mutant mice*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2522-31.
235. Hoffmann, P., et al., *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells*. Blood, 2004. **104**(3): p. 895-903.
236. Hoffmann, P., et al., *Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(3): p. 267-74.
237. Walker, M.R., et al., *Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1437-43.
238. Peltz, G.A., M.L. Trounstine, and K.W. Moore, *Cloned and expressed human Fc receptor for IgG mediates anti-CD3-dependent lymphoproliferation*. J Immunol, 1988. **141**(6): p. 1891-6.
239. Herzenberg, L.A., S.C. De Rosa, and L.A. Herzenberg, *Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine*. Immunology Today, 2000. **21**(8): p. 383-390.
240. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
241. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Immunoblotting in the clinical laboratory*. J Clin Chem Clin Biochem, 1989. **27**(8): p. 495-501.
242. Fedorcsak, I. and L. Ehrenberg, *Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases*. Acta Chem Scand, 1966. **20**(1): p. 107-12.
243. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
244. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
245. Kwok, S. and R. Higuchi, *Avoiding false positives with PCR*. Nature, 1989. **339**(6221): p. 237-8.
246. Hill, G.R., et al., *Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines*. Blood, 1997. **90**(8): p. 3204-13.
247. Blatter, D.D., J.M. Crawford, and J.L. Ferrara, *Nuclear magnetic resonance of hepatic graft-versus-host disease in mice*. Transplantation, 1990. **50**(6): p. 1011-8.
248. Grass, J.A., et al., *Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3140-7.
249. Cooke, K.R., et al., *An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin*. Blood, 1996. **88**(8): p. 3230-9.
250. Goker, H., I.C. Haznedaroglu, and N.J. Chao, *Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management*. Exp Hematol, 2001. **29**(3): p. 259-77.
251. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
252. Walker, L.S., et al., *Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 249-58.
253. Szanya, V., et al., *The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2461-5.

254. Allan, S.E., et al., *The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3276-84.
255. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. **6**(4): p. 279-84.
256. Schmittgen, T.D. and B.A. Zakrajsek, *Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR*. J Biochem Biophys Methods, 2000. **46**(1-2): p. 69-81.
257. Roncador, G., et al., *Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1681-91.
258. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**(1): p. 745-763.
259. Goldman, J.P., et al., *Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain*. Br J Haematol, 1998. **103**(2): p. 335-42.
260. Sun, Y., et al., *Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances*. Translational Research, 2007. **150**(4): p. 197-214.
261. Shankar, G. and D.A. Cohen, *Idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: the role of pre-transplant radiation conditioning and local cytokine dysregulation in promoting lung inflammation and fibrosis*. Int J Exp Pathol, 2001. **82**(2): p. 101-13.
262. Almeida, A.R., et al., *Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4850-60.
263. Furtado, G.C., et al., *Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function*. J Exp Med, 2002. **196**(6): p. 851-7.
264. Setoguchi, R., et al., *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 723-35.
265. Brandenburg, S., et al., *IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1643-53.
266. Taams, L.S., et al., *Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1122-31.
267. Hoffmann, P., et al., *Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4260-7.
268. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler, *Human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 89-98.
269. Bas, A., et al., *Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes*. Scand J Immunol, 2004. **59**(6): p. 566-73.
270. Bustin, S.A., *Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. **5**(4): p. 493-8.
271. Yagi, H., et al., *Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells*. Int. Immunol., 2004. **16**(11): p. 1643-1656.
272. Seddiki, N., et al., *Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2830-8.
273. Valmori, D., et al., *A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1953-62.
274. Gavin, M.A., et al., *Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(17): p. 6659-64.
275. Mantel, P.Y., et al., *Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3593-602.

276. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. Int Immunol, 2007. **19**(4): p. 345-54.
277. Pillai, V., et al., *Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells*. Clin Immunol, 2007. **123**(1): p. 18-29.
278. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 129-38.
279. Allan, S.E., et al., *Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3*. Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3282-9.
280. Chauhan, S.K., et al., *Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 148-53.
281. Gupta, S., et al., *Differential requirement of PKC-theta in the development and function of natural regulatory T cells*. Mol Immunol, 2008. **46**(2): p. 213-24.
282. Kim, H.P. and W.J. Leonard, *CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1543-51.
283. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 152-162.
284. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.
285. Polansky, J.K., et al., *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1654-63.
286. Baron, U., et al., *DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(9): p. 2378-89.
287. Hoffmann, P., et al., *Loss of FOXP3 expression in natural human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation*. Eur J Immunol, 2009.
288. Bresatz, S., et al., *Isolation, propagation and characterization of cord blood derived CD4+ CD25+ regulatory T cells*. Journal of Immunological Methods, 2007. **327**(1-2): p. 53-62.
289. Godfrey, W.R., et al., *Cord blood CD4+CD25+-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function*. Blood, 2005. **105**(2): p. 750-758.
290. Wing, K., et al., *CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses*. Immunology, 2005. **115**(4): p. 516-25.
291. Zorn, E., *CD4+CD25+ regulatory T cells in human hematopoietic cell transplantation*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(2): p. 150-9.
292. Brown, J.A. and V.A. Boussiotis, *Umbilical cord blood transplantation: Basic biology and clinical challenges to immune reconstitution*. Clinical Immunology, 2008. **127**(3): p. 286-297.
293. Hauri-Hohl, M.M., et al., *Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation*. Blood, 2007. **109**(9): p. 4080-8.
294. Kataoka, Y., et al., *The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease*. Immunology, 2001. **103**(3): p. 310-8.
295. Nguyen, V.H., et al., *The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2008. **111**(2): p. 945-53.
296. Storek, J., et al., *Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2001. **98**(2): p. 489-91.
297. Storek, J., et al., *Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Transplantation, 2002. **73**(7): p. 1154-8.
298. Krenger, W. and G.A. Hollander, *The immunopathology of thymic GVHD*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(4): p. 439-56.
299. Stamenkovic, I. and B. Seed, *CD19, the earliest differentiation antigen of the B cell lineage, bears three extracellular immunoglobulin-like domains and an Epstein-Barr virus-related cytoplasmic tail*. J Exp Med, 1988. **168**(3): p. 1205-10.

300. Edinger, M., et al., *Evaluation of effector cell fate and function by in vivo bioluminescence imaging*. Methods, 2003. **31**(2): p. 172-9.
301. Nguyen, V.H., et al., *In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation*. Blood, 2007. **109**(6): p. 2649-56.
302. Batten, P., et al., *Human anti-mouse xenorecognition. Provision of noncognate interactions reveals plasticity of T cell repertoire*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1057-65.
303. Tary-Lehmann, M., et al., *Anti-SCID mouse reactivity shapes the human CD4+ T cell repertoire in hu-PBL-SCID chimeras*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1817-27.
304. Alter, B.J. and F.H. Bach, *Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens*. J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 333-8.
305. Ihrcke, N.S., et al., *Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions*. Immunol Today, 1993. **14**(10): p. 500-5.
306. Samstein, B. and J.L. Platt, *Xenotransplantation and tolerance*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1409): p. 749-58.
307. Lucas, P.J., et al., *The human antimurine xenogeneic cytotoxic response. I. Dependence on responder antigen-presenting cells*. J Immunol, 1990. **144**(12): p. 4548-54.
308. Murphy, W.J., et al., *Human-mouse lymphoid chimeras: host-vs.-graft and graft-vs.-host reactions*. Eur J Immunol, 1992. **22**(6): p. 1421-7.
309. Wilson, J., et al., *Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 387-98.
310. Fast, L.D., et al., *Mirasol PRT treatment of donor white blood cells prevents the development of xenogeneic graft-versus-host disease in Rag2-/-gamma c-/- double knockout mice*. Transfusion, 2006. **46**(9): p. 1553-60.
311. Ferrara, J.L. and W. Krenger, *Graft-versus-host disease: the influence of type 1 and type 2 T cell cytokines*. Transfus Med Rev, 1998. **12**(1): p. 1-17.
312. Mohty, M. and B. Gaugler, *Inflammatory cytokines and dendritic cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 53-63.
313. Apostolopoulos, V., et al., *A role for IL-5 in the induction of cytotoxic T lymphocytes in vivo*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1733-9.
314. Shultz, L.D., et al., *NOD/LtSz-Rag1nullPfpnull mice: a new model system with increased levels of human peripheral leukocyte and hematopoietic stem-cell engraftment*. Transplantation, 2003. **76**(7): p. 1036-42.
315. Hesselton, R.M., et al., *High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice*. J Infect Dis, 1995. **172**(4): p. 974-82.
316. Greiner, D.L., et al., *Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice*. Am J Pathol, 1995. **146**(4): p. 888-902.
317. Hupples, W., et al., *Acute human vs. mouse graft vs. host disease in normal and immunodeficient mice*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 197-206.
318. Petrovic, A., et al., *LPAM (alpha 4 beta 7 integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1542-7.
319. Dutt, S., et al., *L-selectin and beta7 integrin on donor CD4 T cells are required for the early migration to host mesenteric lymph nodes and acute colitis of graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **106**(12): p. 4009-15.
320. Traggiai, E., et al., *Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice*. Science, 2004. **304**(5667): p. 104-7.
321. Silverberg, D.S., et al., *The pathological consequences of anaemia*. Clin Lab Haematol, 2001. **23**(1): p. 1-6.

- 322. Mutis, T., et al., *Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2^{-/-}-gammac^{-/-} immunodeficient mice*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5520-5.
- 323. Hippen, K.L., et al., *Umbilical cord blood regulatory T-cell expansion and functional effects of tumor necrosis factor receptor family members OX40 and 4-1BB expressed on artificial antigen-presenting cells*. Blood, 2008. **112**(7): p. 2847-57.
- 324. Shevach, E.M., et al., *The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 60-73.
- 325. Tran, D.Q., et al., *Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3⁺ regulatory T cell suppressor function*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2929-38.

8 Anhang

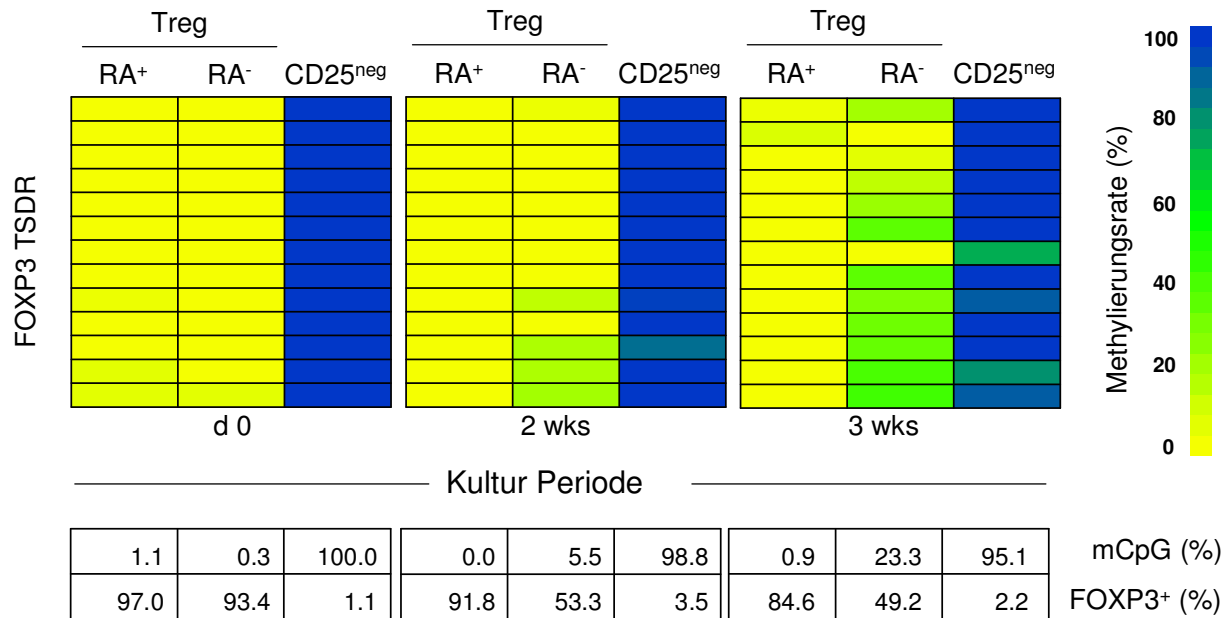


Abb. 8-1: Methylierung der TSDR des FOXP3-Gens in frisch isolierten und *in vitro* expandierten RA⁺ und RA⁻ Treg-Zellen.

Jedes Kästchen repräsentiert die Methylierungsrate eines CpG-Motivs der TSDR der jeweiligen Subpopulation, die anhand eines Farbcodes dargestellt ist (gelb: 0 % Methylierung; blau: 100 % Methylierung;). Der Grad der Methylierung aller CpG-Motive der TSDR (mCpG (%)) sowie der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil FOXP3⁺ Zellen jeder Zellpopulation ist in der Tabelle zusammengefasst. Die Methylierungsanalysen entstanden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe um Jochen Huehn (Charité, Berlin).

9 Publikationen

Wissenschaftliche Originalveröffentlichungen

Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R, Edinger M. *Loss of FOXP3 expression in natural human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation.* Eur J Immunol. 2009 Mar 12. [Epub ahead of print]

Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Türbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. *DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells.* Eur J Immunol. 2007 Sep;37(9):2378-89.

Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, Edinger M. *Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion.* Blood. 2006 Dec 15;108(13):4260-7.

Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, Dada A, Niemand C, Assenmacher M, Orsó E, Andreesen R, Holler E, Edinger M. *Isolation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells for clinical trials.* Biol Blood Marrow Transplant. 2006 Mar;12(3):267-74.

Hoffmann P, Boeld TJ, Piseshka B, Edinger M. *Immunomodulation after allogeneic bone marrow transplantation by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.* Microbes Infect. 2005 Jun;7(7-8):1066-72. (Review)

Posterpräsentationen

Tina J. Boeld, Andrea Havasi, Rüdiger Eder, Kathrin Dummer, Biserka Piseshka, Reinhard Andreesen, Petra Hoffmann and Matthias Edinger

Maintained FOXP3 Gene Expression in Human CD25^{high} Regulatory T Cells

3rd Cellular Therapy Meeting, Regensburg, März 17-18, 2005

Tina J. Boeld, Rüdiger Eder, Jasmin Stahl, Eva Typlt, Annabell Schuster, Reinhard Andreesen, Petra Hoffmann and Matthias Edinger

In vitro Expanded Human CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁺ Regulatory T Cells Initially Suppress Conventional T Cells in Xenogeneic Graft-versus-Host Disease

34th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Florenz, März 30- April 2, 2008

Tina J. Boeld, Rüdiger Eder, Jasmin Stahl, Ellen Obermann, Reinhard Andreesen, Petra Hoffmann and Matthias Edinger

The CD45RA⁺ Subpopulation of CD4⁺CD25^{high} Human Regulatory T Cells Suppresses Early Expansion of Conventional T Cells in RAG2^{-/-}γc^{-/-} Mice

5th Cellular Therapy Meeting, Nürnberg, März19-20, 2009

Vorträge

Tina J. Boeld, Andrea Havasi, Rüdiger Eder, Kathrin Dummer, Biserka Piseshka, Reinhard Andreesen, Petra Hoffmann and Matthias Edinger

Human CD25^{high} Regulatory T Cells Maintain FOXP3 Gene Expression After In Vitro Expansion

1st ESH-EBMT Euroconference on GvHD/GvL, Sesimbra, Portugal, Juni 16-19, 2005

Tina J. Boeld, Rüdiger Eder, Jasmin Stahl, Ellen Obermann, Reinhard Andreesen, Petra Hoffmann and Matthias Edinger

Transfer of in vitro expanded human CD45RA⁺CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells inhibits early expansion of conventional T cells in immunodeficient Rag2^{-/-}γc^{-/-} mice

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, Dgfl), Wien, September 3-6, 2008

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mir bei der Anfertigung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gebührt vor allem Prof. Dr. Matthias Edinger für das in mich gesetzte Vertrauen und die Betreuung dieser Arbeit. Er förderte mich auf allen Ebenen und ermöglichte mir die Teilnahme an internationalen Kongressen. Sein stets freundschaftliches Verhältnis sowie das Engagement bei der Korrektur dieser Arbeit waren mir eine große Unterstützung.

Herrn PD. Dr. Thomas Langmann möchte ich herzlich danken für die stets freundliche Kommunikation und für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Andreesen, dem Leiter der hämatologischen Abteilung, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und für die großzügige Unterstützung während dieser Zeit bedanken. Von seiner Bestrebung, ein Klima des engagierten Austausches zwischen Forschung und Klinik in der Abteilung zu schaffen, habe ich sehr profitiert.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe:

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Petra Hoffmann für das in mich gesetzte Vertrauen, die fachliche Unterstützung und kompetente Beratung bei der Bearbeitung meines Themas sowie für die stets anregenden Diskussionen danken.

Rüdiger Eder, Jasmin Stahl, Kathrin Dummer, Andrea Havasi, Annabell Schuster und Eva Typlt möchte ich besonders für ihre Hilfe und die motivierte Zusammenarbeit danken.

Ferner danke ich den weiteren Laborkollegen der AG Edihoff Julia Albrecht, Kristina Doser, Katrin Kosovac, Leo Hansmann, Jaqueline Igl, Anna Jobst, Christine Luginger, Sandra Vogl und Claudia Weber für die nette Zusammenarbeit.

Ein ganz persönlicher Dank geht an Biserka Piseshka für ihre fachliche und freundschaftliche Hilfe den Laboralltag zu jeder Tages- und Nachtzeit zu meistern.

Selbstverständlich gebührt auch den anderen Mitarbeitern der Häma-Onko, der AG Rehli, der allo-KMT- und der Carreras-Gruppe, mein Dank für ihre Unterstützung sowie die vielen netten Stunden bei den Festlichkeiten der Abteilung. Ein riesiges Dankeschön geht natürlich auch an Dr. Simon Völkl (Sam), der stets für positive Ablenkung sorgte (... ach ja, die Antikörper...bring ich dir mit, wenn ich mal nach Erlangen komme.).

Vielen Dank an Michaela Paul und Dr. Andrea Hauser, die bereitwillig meine Arbeit Korrektur gelesen haben.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich, mein Studium und die Promotion erst möglich gemacht haben. Diese Arbeit ist nicht minder euer Verdienst. Danke für alles!

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei Jörg bedanken. Vielen, lieben Dank für deine Geduld und für alles, was du für mich tust und getan hast.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____

(Tina Böld)